

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Fundamento y Aplicaciones de Sistemas de Especiación con
“Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente”
(LC-ICP-MS y GC-ICP-MS)**

**Monografía previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Químicas con mención en Química Analítica**

DALILA ESTEFANÍA ROSERO VALLES

Quito, 2017

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Monografía de Licenciatura en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica, de la Srta. Dalila Estefanía Rosero Valles ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc.Santiago Ampudia V

Director de la monografía

Quito, 06 de julio del 2017

AGRADECIMIENTO

“La ciencia no nos ha enseñado aún si la locura es o no lo más sublime de la inteligencia” -Edgar Alan Poe- .

En primer lugar, agradezco al azar y a las circunstancias de la vida, he logrado lo que muchas personas anhelan alcanzar, culminar la carrera que tanto me apasiona, con muchos obstáculos sí, pero siempre en pie. La fortaleza que he tenido la debo a mi familia, aunque se encuentre lejos, siempre recuerdo las enseñanzas y valores que me han inculcado. Muchas gracias por su esfuerzo, queridos papá y mamá, y mil gracias hermano Flavio por creer en mí y darme esta segunda oportunidad, y gracias hermano Diego por tus ánimos.

También, quiero agradecer a M.Sc. Isabel Cipriani por su excelente enseñanza y ser quien me impulsó a hacer ésta investigación. Quiero dar mi enorme gratitud a M.Sc. Santiago Ampudia, director de esta monografía de grado, por su apoyo, paciencia y preocupación.

Finalmente, agradezco y dedico este trabajo de investigación a quien fue mi segunda mamá y mejor amiga. Abuelita donde quiera que estés, este último esfuerzo lo hice por ti, porque sé que no habría persona más feliz en este mundo que tú por verme graduada.

Este trabajo no es el fin, y este título solo es el inicio de grandes cosas que deseo alcanzar.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1.GENERALIDADES	6
1.1. ESPECIE QUÍMICA.....	6
1.2. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN	6
1.3. ESPECIES DE INTERÉS	8
1.3.1. MERCURIO	8
1.3.2. ARSÉNICO.....	10
1.3.3. CROMO	12
1.4. NORMATIVAS VIGENTES	12
CAPÍTULO 2.ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS) COMO DETECTOR CROMATOGRÁFICO	15
2.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	15
2.1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	16
2.1.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	18
2.2. TÉCNICAS ACOPLADAS.....	21
2.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE	22
2.3.1. INSTRUMENTACIÓN.....	24
2.3.2. INTERFERENCIAS	34

2.3.3. COMPARACIÓN DEL ICP-MS CON OTRAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA.....	39
CAPÍTULO 3.SISTEMAS DE ESPECIACIÓN LC-ICP-MS Y GC-ICP-MS	40
3.1. REQUERIMIENTOS PARA EL ACOUPLE LC O GC CON ICP-MS	40
3.2. ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA A ESPECTROMETRÍA DE PLASMA-MASAS.....	41
3.2.1. INTERFACE	42
3.2.2. AJUSTE Y OPTIMIZACIÓN.....	43
3.3. ACOPLAMIENTO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE.....	44
3.3.1. INTERFACE	45
3.3.2. AJUSTE Y OPTIMIZACIÓN.....	45
3.4. APLICACIONES DE LOS SISTEMAS DE ESPECIACIÓN: LC-ICP-MS Y GC-ICP-MS	48
3.4.1. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS ACOPLADAS A CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE MERCURIO.....	48
3.4.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN CABELLO POR HPLC-ICP-MS.....	50
3.4.3. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN AGUA DE MAR MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GC-ICP-MS	52
3.4.4. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ORINA MEDIANTE HPLC-ICP-MS	55
3.4.5. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ARROZ INTEGRAL MEDIANTE HPLC-ICP-MS	58

3.4.6. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN JUGO DE MANZANA MEDIANTE HPLC-ICP-MS	60
3.4.7. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE CROMO EN AGUA MEDIANTE HPLC-ICP-MS	62
3.4.8. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO Y CROMO (VI) POR HPLC-ICP-MS	66
CAPÍTULO 4.CONCLUSIONES.....	69
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
FIGURAS	78
.....	86
TABLAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAS	Espectrometría de Absorción Atómica
AES	Espectrometría de Emisión Atómica
AFS	Espectrometría de Fluorescencia Atómica
BCR	Oficina de Referencia de la Comunidad
CEM	Multiplicador de electrones de Channeltron
CRC	Celda de Colisión/Reacción
CV-AAS	Espectrometría de Absorción Atómica de Vapor Frio
DMA	Ácido dimetil arsénico
DRC	Celda de Reacción Dinámica
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente
FAAS	Espectrometría de Absorción Atómica de Llama
GC	Cromatografía de Gases
GH-AAS	Espectrometría de Absorción Atómica de Horno de Grafito
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
ID	Dilución Isotópica
ISTP	Ingesta Semanal Tolerable Provisional
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
KED	Discriminación de Energía Cinética
LC	Cromatografía Líquida
MMA	Ácido metil arsónico
NIST	National Institute of Standards and Technology
NRCC	National Research Council of Canada
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEEK	Poliéter étercetona
RSD	Desviación Estándar Relativa
SPME	Microextracción en Fase Sólida
TBAH	Tetrabutylamonio
TMAO	Óxido de Trimetilarsina

RESUMEN

El presente trabajo, tuvo como objetivo revisar algunas aplicaciones de sistemas de especiación con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se ha tomado en cuenta a la cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), por ser las técnicas más utilizadas en los acoplamientos de especiación. Mediante la investigación bibliográfica en revistas científicas, tesis doctorales, libros manuales y publicaciones científicas en general, se ha logrado estudiar las técnicas cromatográficas como medio de separación de las diferentes formas químicas que presenta un elemento y la ICP-MS como instrumento de detección de dichas especies químicas. Ésta monografía describe el fundamento, instrumentación, aplicaciones, ventajas y desventajas de estos sistemas de especiación con ICP-MS. Se concluyó que estos acoplamientos permiten el análisis de una gran variedad de matrices como muestras biológicas, aguas, orina, alimentos, entre otros, sin importar su complejidad, dando resultados con bajos límites de detección y cuantificación en un amplio rango dinámico. Sobre todo se destaca la capacidad de obtener información adicional de un elemento a través de sus formas químicas, las cuales serían imposibles determinar con otra metodología.

ABSTRACT

The aim of this work was to review some applications of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in speciation systems with special interest on gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) due to their widely use as hyphenated techniques. Through a bibliographic research in scientific journals, dissertations, handbooks and scientific publications in general, it has been possible to review the chromatographic techniques that separate chemical forms and ICP-MS as a tool for detection of these chemical species. This monograph described the basis, instrumentation, advantages, disadvantages and applications of speciation systems with ICP-MS. It was concluded that these hyphenations allow the analysis of a variety of matrices (biological samples, water, urine, food, among others) regardless of its complexity. Besides, these techniques are able to obtain results with low limits of detection and quantification, within a wide dynamic range. Especially stands out on the ability to get additional information for an element through their chemical forms, which would be impossible to determine with another methodology.

Keywords: inductively coupled plasma (ICP), gas chromatography (GC), speciation analysis, liquid chromatography (LC), mass spectrometry (MS), chemical forms.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, el análisis elemental inorgánico ha sido realizado para investigar la presencia y concentración de elementos traza en una muestra; sin embargo, la información que se puede obtener por medio de la determinación elemental total en relación a características físico-químicas como actividad biológica, toxicidad, movilidad, y biodisponibilidad es limitada. Dicha información solo puede ser obtenida a través del análisis de las especies químicas (diferentes formas de un elemento).

El análisis de especiación identifica y cuantifica la cantidad de una o más especies en una muestra, lo cual ayuda a tener una mayor comprensión del comportamiento de los elementos en el medio. La necesidad de un sistema de especiación es que por el momento sería la única manera de determinar algunas especies como el MetHg. El análisis de especiación se ha hecho fundamental en las áreas: ambiental, seguridad alimentaria y farmacéutica, siendo útil para estudiar la actividad biológica, ciclo ambiental y vías metabólicas de dichos elementos.

En cuanto la legislación sobre salud y medio ambiente, existen requisitos para aguas potables y aguas residuales, debido a que se puede encontrar elementos tanto en su forma de nutriente esencial como tóxica. En la industria alimenticia, la contaminación puede resultar fácilmente del contacto del alimento con cualquier envase o contenedor utilizado durante la fabricación. Además, cualquier producto de exportación, se convierte en objeto de observación y

comprobación del cumplimiento de los requisitos del país de destino. Por lo tanto, el cumplimiento de estos reglamentos requiere un análisis de especiación para formas tóxicas de elementos tales como: cromo, arsénico y mercurio.

En términos de la industria farmacéutica, los capítulos de la Farmacopea de los Estados Unidos 232/233 han aumentado la demanda para el rastreo elemental en los productos farmacéuticos, sugieren que el análisis de especiación es un método apropiado para determinar si el arsénico y mercurio están presentes en su forma inorgánica u orgánica, y si superan su límite máximo permisible.

En virtud de estos requerimientos, desde la década de los ochenta, se han ido desarrollando y perfeccionando técnicas acopladas, donde el ICP-MS se usa como sistema de detección para una técnica de separación. El ICP-MS es el detector de elección debido a que este instrumento requiere de una interface sencilla. Además, posee un amplio rango dinámico lineal, capacidad de análisis multi-elemental de la mayoría de elementos de la tabla periódica, análisis de isótopos, y un elevado poder de detección y cuantificación en corto tiempo. No obstante, la complejidad en la instrumentación y alto costo ha sido un obstáculo para lograr una amplia estandarización de métodos analíticos.

Dos elementos, el arsénico y mercurio, son los principales ejemplos de la necesidad de análisis de especiación. Ambos elementos presentan diferentes toxicidades entre sus formas inorgánicas y orgánicas. El arsénico (As) en su forma inorgánica As (III) y As (V) ha sido considerado como altamente tóxico, mientras que la forma orgánica (arsenobetaína) se ha denominado como inofensiva. Por otro lado, los compuestos orgánicos de mercurio, tales como el metilmercurio (MetHg), son mucho más tóxicos que las sales de mercurio

inorgánico (Hg^{2+}). Otro elemento importante que requiere análisis de especiación es el cromo; el cromo (III) es un elemento esencial en los seres humanos, mientras que el cromo (VI) es una forma química cancerígena.

Con la finalidad de facilitar la lectura y comprensión de este trabajo, se detalla el contenido a continuación:

El contenido se desarrolla en cuatro capítulos. En el capítulo I se presentan las generalidades, donde se define el concepto de especie química y de análisis de especiación. También, describe la importancia del análisis de especiación y se indica los analitos de interés de este trabajo. Además, se da a conocer las normativas vigentes para el análisis de especies químicas tanto a nivel nacional como internacional.

En el capítulo II se presenta el principio de la cromatografía y una breve comparación entre cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC) como técnicas de separación. Se describe a la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente junto a su instrumentación, y se realiza una comparación del ICP-MS con otras técnicas de detección elemental.

En el capítulo III se dan a conocer los requerimientos generales necesarios para acoplar sistemas de especiación LC y GC con ICP-MS. Se estudia el sistema de especiación LC-ICP-MS, sus características e interface, y del mismo modo el sistema GC-ICP-MS. Se proponen ocho casos de estudio aplicando estos sistemas de especiación en tres elementos importantes: mercurio, arsénico y cromo en diferentes matrices.

Finalmente, en el capítulo IV, se presenta las conclusiones y recomendaciones obtenidas en este trabajo de investigación.

CAPÍTULO 1.GENERALIDADES

1.1.ESPECIE QUÍMICA

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), una especie química se define como una forma de un elemento específico con respecto a su composición isotópica, electrónica o estado de oxidación, y/o complejidad o estructura molecular (IUPAC, 2006).

Las especies o analitos pueden ser tan simples como iones elementales de varios estados de oxidación en solución, o tan complejas como mezclas de pesticidas o bio-moléculas.

1.2.ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN

El análisis de especiación denota las actividades de la química analítica para identificar y/o medir las cantidades de una o más especies químicas en una muestra (IUPAC, 2006).

En otras palabras, el análisis de especiación determina la ocurrencia de un elemento en particular en sus diversas formas como diferentes estados de oxidación o en combinación con varios ligandos, en una variedad de matrices como alimentos, tejidos animales, o muestras ambientales (Michalski,Jablonska, Szopa&Liko, 2011).

Un ejemplo común podría ser la medición de Cr (VI) (tóxico), Cr (III) (nutriente esencial) y Cr total (muestras ambientales). Otros casos de especiación elemental son As (III)/As (V), Se (IV)/Se (VI), y otros elementos que pueden existir

en diferentes estados de oxidación estables. Así también los elementos As y Se pueden existir en varias formas orgánicas (Sperling,2015).

El análisis de especiación tiene especial importancia en las áreas de medio ambiente, alimentos e industrias. Permite revelar información adicional a la dada por las concentraciones de elementos totales, como (Li *et al.*, 2007; Sperling, 2015):

- ❖ Biodisponibilidad
- ❖ Bioacumulación y biomagnificación
- ❖ Toxicidad y valor nutricional
- ❖ Movilidad ambiental y persistencia
- ❖ Volatilidad
- ❖ Reactividad

El análisis de especiación trata de proveer dicha información para asegurar la calidad de un producto y seguridad para los consumidores, eficiencia de procesos con respecto a materias primas, energía y producción de desechos, seguridad en plantas de producción y área de trabajo, cumplimiento de las normas y legislación, y la ausencia de riesgos para el medio ambiente y sus habitantes.

1.3. ESPECIES DE INTERÉS

Las especies de interés se pueden dividir en tres categorías, en la primera se encuentran los elementos que presentan diferentes estados redox como: Se (IV), Se (VI); As (III), As (V); Sb (III), Sb (V); Cr (III), Cr (VI); Fe (II), Fe (III). El segundo grupo de interés son compuestos organometálicos como: Met-As, Ge, Hg, Sb, Se, Sn; Et-Hg, Pb; Butil-Sn; Fenil-Sn; Ciclohexil-Sn; Octil-Sn. Y finalmente las macromoléculas como: metalproteínas, metalofármacos, metaloporfirinas y metaloenzimas (Sayago, Cameán, Repetto & Asuero, 2012).

A continuación, una breve descripción de las propiedades y efectos de las especies de mercurio, arsénico y cromo, los cuales se seleccionaron como elementos de interés del presente trabajo debido al gran número de estudios encontrados.

1.3.1. MERCURIO

El mercurio (Hg) se presenta de forma natural en el medio ambiente, en suelos superficiales, aguas y sedimentos. También es producido de actividades antropogénicas, en procesos industriales, minería, combustión de fósiles e incineración de residuos, además se puede liberar de productos como: amalgamas dentales, focos fluorescentes, termómetros, baterías, entre otros. Se presenta como mercurio elemental en su estado basal, pero es difícil encontrarlo en este estado en la naturaleza, debido a que se evapora fácilmente a temperatura ambiente (Weinberg, 2010).

Las formas químicas más frecuentes del mercurio en la naturaleza están formando compuestos inorgánicos de mercurio o sales de mercurio y compuestos

orgánicos. Algunos procesos que ocurren naturalmente, pueden convertir una forma de mercurio a otra. Éste es el caso de las reacciones químicas en la atmósfera, las cuales convierten el mercurio elemental a mercurio inorgánico. A su vez, ciertos microorganismos pueden convertir el mercurio inorgánico a orgánico como metilmercurio (Weinberg, 2010).

Las sales de mercurio más comunes son: sulfuro de mercurio o cinabrio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro de mercurio (HgCl_2). Estas especies tienen un tiempo de permanencia en el aire menor que el mercurio elemental, debido a que son más reactivas y solubles en agua (ionizándose como Hg^{2+}).

El mercurio orgánico se obtiene al combinar mercurio con carbono y otros elementos, denominándose compuestos organomercúricos. Por ejemplo: dimetilmercurio, acetato de fenilmercurio y cloruro de metilmercurio. Siendo el metilmercurio la forma química más común y tóxica en el ambiente (Weinberg, 2010).

El metilmercurio (MetHg) compone un promedio del 95% del mercurio total en los tejidos de pescado. El mercurio no es un elemento esencial y todas sus especies presentan toxicidad en diferente grado (Nevado *et al.*, 2011). El MetHg es la forma más tóxica encontrada en la naturaleza, principalmente a través de una dieta basada en mariscos y pescados. Esta forma afecta el sistema inmunológico, riñones, pulmones, funcionamiento del cerebro, sistema cardiovascular y por ende incrementa la posibilidad de muerte (Li *et al.*, 2007). Además, los compuestos de metilmercurio pueden ser cancerígenos según la Agencia Internacional de la Investigación de Cáncer (FAO, 2015) y pueden bioacumularse y biomagnificarse, debido a que penetran muy fácilmente las

membranas biológicas de animales marinos, acumulando concentraciones de metilmercurio miles de veces a la encontrada en el agua de su entorno. También, los niveles de metilmercurio se van incrementando al ir ascendiendo en la cadena alimenticia, debido a que el mercurio no puede descomponerse en una forma más simple e inocua, dando lugar al proceso de biomagnificación (Selin, 2009).

1.3.2. ARSÉNICO

El arsénico (As) es un metaloide tóxico, ampliamente distribuido en el medio ambiente y varios sistemas biológicos. Se encuentra sedimentado en aguas superficiales como resultado de una actividad volcánica, hay emisiones antropogénicas en la industria de acero, desechos de animales y de combustibles fósiles (Jaklonska, 2015). Es usado como un preservante de madera, como pesticida, como agente clarificante de vidrio, y como material en la fabricación de semiconductores. Además, el trióxido de arsénico se utiliza como agente terapéutico para leucemia aguda (Tokumoto, Kutsukake, Katsuta, Anan & Ogra, 2014).

La toxicidad del As depende de la forma química, siendo su configuración inorgánica cien veces más tóxica que las especies orgánicas. Los compuestos inorgánicos de As son cancerígenos, así mismo son fuertes contaminantes ambientales. El arsénico inorgánico existe como arsenito (As^{+3}), arsenato (As^{+5}) y el arsénico orgánico como ácido metil arsónico (MMA), ácido di-metil arsónico (DMA) y otros compuestos. El As (III) es la forma más tóxica, el As (V) y las formas metiladas MMA y DMA son las formas menos tóxicas, siendo el DMA la forma menos tóxica de las cuatro especies. Existen otros compuestos de arsénico

orgánico como la arsenobetaina y la arsenocolina, pero estos se han reportado como no tóxicos en ratas (Michalski *et al.*, 2011).

El arsénico presenta gran movilidad en tejidos animales donde su forma inorgánica es transformado en los metabolitos metilados (MMA y DMA). Siendo la enzima arsénico-metiltransferasa (As_3MT) la que cataliza dicha metilación (Jaklonska, 2015; Tokumoto *et al.*, 2014).

La exposición prolongada al arsénico puede causar varios problemas de salud, debido que interfiere en las reacciones enzimáticas. El efecto más común se observa sobre la piel con lesiones cutáneas, cambios de pigmentación, callosidades e incluso cáncer a la piel. Además, puede causar cáncer de vejiga y pulmón, problemas respiratorios en general, problemas cardiovasculares como el infarto de miocardio, problemas reproductivos como aborto espontaneo y malformaciones congénitas (Jaklonska, 2015; OMS, 2016).

En el año 2004 se conoció que en la localidad de Tumbaco se distribuía agua potable con cantidades de arsénico superiores a lo normal, ya que habitualmente se encuentra solo pequeñas cantidades de arsénico en pozos subterráneos, no obstante hay zonas donde existe contaminación geológica natural. Se realizó el análisis de cabello a los pobladores afectados, dichas muestras fueron analizadas en Canadá, donde de 830 muestras, 320 resultaron positivas de contaminación de arsénico. La toxicidad de esta agua fue de 3,8 veces mayor de la norma establecida por el INEN que es $10\mu L/L$ (Boteco, 2007; Weemaels, 2006).

1.3.3. CROMO

El interés en el cromo (Cr) se basa en las diferentes características toxicológicas de sus formas químicas. La especie Cr (III) se encuentra en pequeñas cantidades en todos los organismos, juega un rol importante en el metabolismo de la glucosa, siendo un nutriente esencial para el cuerpo humano (Baralkiewiez, 2013). Además, el cromo trivalente es componente de algunas enzimas que estimulan funciones importantes en el organismo. Por otro lado, la configuración Cr (VI), es un serio problema para el medio ambiente debido a su elevado poder oxidante y gran facilidad de penetrar las membranas biológicas de los organismos (Baralkiewiez, 2013), generando problemas mutagénicos y genotóxicos. Esta especie es muy soluble en agua, presenta mayor movilidad y biodisponibilidad que el Cr (III) (Jaklonska, 2015).

Los compuestos de cromo frecuentemente se usan en diversas aplicaciones industriales, incluyendo la metalurgia para endurecer el acero y para la fabricación de acero inoxidable, el 90% del cuero se curte usando cromo, en colorantes y pigmentos (verde claro, amarillo, rojo y colores naranja), en la galvanoplastia como es el cromado para dar un acabado de espejo al acero, y en la síntesis orgánica como agente de oxidación y catalizador (Michalskiet *al.*, 2011; RSC, 2016).

1.4. NORMATIVAS VIGENTES

La mayoría de laboratorios analíticos en el Ecuador llevan a cabo determinaciones de elemento total, debido a que los límites máximos permisibles

solo se basan en la concentración total de elemento. De acuerdo con la Norma Técnica Ecuatoriana del Instituto Ecuatoriano de Normalización (NTE INEN 1108:2011) pide como requisito en aguas potables la determinación total de cromo y arsénico; el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) exige en aguas de consumo humano la determinación total de As, Hg, Cd, Fe, Pb, (CN)⁻, Se y solamente el cromo como especie en forma de Cr hexavalente; el Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas del Ecuador (RAOHE), norma el tratamiento de aguas para descargas residuales ya sean industrializadas o aguas negras o grises, entre otros parámetros fisicoquímicos solo exige el límite de cromo y plomo total.

En cuanto a laboratorios, el Instituto Nacional de Investigación Geológico Minero y Metalúrgico (INIGEMM), realiza análisis elemental total de más de 50 elementos y solo realiza análisis de especiación de mercurio inorgánico en sedimentos y rocas mineralógicas. La Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), realiza ensayos de plomo total, cianuro total, plaguicidas, entre otros. En laboratorios ambientales, el único análisis de especiación frecuente es la determinación de cromo hexavalente por colorimetría en aguas (NTE INEN-ISO 17075, 2014) o por espectrofotometría de absorción atómica por generación de hidruros (GH-AAS) (Castelo, 2015).

A nivel regional, en América Latina cada vez se crean más métodos de especiación debido a que los organismos BCR, NRCC y NIST aseguran la disponibilidad de materiales de referencia certificados de la mayoría de componentes organometálicos (Lobinsky&Szpunar, 2007), y ya existen laboratorios de rutina especializados en el análisis de especiación elemental,

cuyos servicios cubren todas las partes del mundo, como SGS e Intertek. Sin embargo, a nivel de región y en otras partes del mundo, el análisis de especiación aún se sigue desarrollando debido a la gran cantidad de analitos en variedad de matrices y por la complejidad de la instrumentación; además, una de las razones para que esto ocurra es que la mayoría de legislaciones no demanda estrictamente el análisis de especiación.

La Autoridad de Seguridad Alimentaria en Europa (EFSA) por su parte, ha declarado que requiere de estudios de especiación en arsénico para poder estimar el riesgo que enfrenta la población al exponerse al arsénico inorgánico (Sperling, 2015).

Se ha establecido la cantidad máxima permisible de Cr (VI) en agua potable por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 50 µg/L (Baralkiewiez, 2013); además recomienda una Ingesta Semanal Tolerable Provisional (ISTP) de 1,6 µgMetHg/Kg de peso corporal, la Agencia de Medio Ambiente (EPA, Food and DrugsAdministration) estableció un valor más restrictivo de 0,7 µg/Kg de MetHg. Para el arsénico el límite recomendado en agua potable es de 10 µg/L (OMS, 2016).

CAPÍTULO 2.ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS) COMO DETECTOR CROMATOGRÁFICO

2.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Las técnicas cromatográficas de importancia para este estudio son la cromatografía líquida y la cromatografía de gases, siendo las técnicas más utilizadas para formar sistemas de especiación, al acoplar la técnica cromatográfica de separación con un equipo ICP-MS, el cual detecta las especies de interés.

Se llama cromatografía, al grupo de técnicas utilizadas para la separación de componentes en mezclas, la determinación de sustancias y en la purificación de compuestos. Todas las técnicas cromatográficas se basan en el mismo principio, la retención selectiva de acuerdo a interacciones entre una fase móvil y una fase estacionaria con el objetivo de separar los diferentes componentes en una mezcla.

La fase móvil consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interactúan de manera distinta con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando (González, 2012).

2.1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

En la cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase estacionaria. La separación cromatográfica en cromatografía líquida es el resultado de interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria. La muestra a introducirse tiene que ser líquida, no necesita ser vaporizada, por lo que cualquier sustancia puede ser potencialmente analizada (Skoog, West, Holler & Crouch, 2007). La HPLC posee las siguientes características siguientes características:

- ❖ Aplicabilidad casi universal, la mayoría de muestras pueden ser separadas por HPLC.
- ❖ No está limitada por la estabilidad térmica o volatilidad de las muestras.
- ❖ Es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, polímeros y una variedad de grupos polifuncionales de alto peso molecular.
- ❖ El HPLC ofrece una gran variedad de combinaciones de fases móviles y fases estacionarias para mejorar las interacciones selectivas.

La técnica de cromatografía líquida más ampliamente utilizada es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual incluye varias modalidades mostradas en la Tabla 1.

La última tendencia es la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, siglas en inglés), surgió debido a que el rendimiento de la HPLC limitaba su eficacia. Por lo que usa columnas más cortas con un tamaño de partícula porosa menor a 2 μm permitiendo aumentar la presión de la fase móvil a través de la columna con mínima dispersión, produciendo picos más

estrechos. Los beneficios son mayor eficiencia de separación, mejor resolución y sensibilidad, tiempos de análisis menores y menor consumo de eluyente (WATERS, 2017).

Un cromatógrafo líquido de alta resolución está formado por las siguientes partes principales:

Sistema de bombas

Provee de una presión y caudal adecuado para una absorción reproducible de solventes y muestras. Las bombas recíprocas son las más utilizadas, consiste en una pequeña cámara con un pistón con movimiento en vaivén y de dos válvulas que se abren y cierran alternativamente para el ingreso o salida del fluido (Gomis, 2008).

Sistema de inyección de la muestra

Permite la introducción de pequeños volúmenes (0,5- 500 μL) de muestra en la columna de manera precisa, existe bucles específicos para la cantidad que se desea inyectar (Gomis, 2008).

Columna

Las columnas son de acero inoxidable, con una longitud entre 3 y 30 cm, en cuyo interior contienen la fase estacionaria que retiene el analito selectivamente, generalmente son partículas porosas de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico (Gomis, 2008).

Detector

Una vez separados los componentes en la columna se requiere su detección, existen dos tipos de detectores: los detectores basados en una propiedad de disolución que responden a una propiedad de la fase móvil (índice de refracción, constante dieléctrica, densidad), que se modifica por la presencia de analitos. Y el segundo tipo son los detectores basados en una propiedad del soluto (UV de diodos, fluorescencia, entre otros), responden a alguna propiedad del soluto, que no son propias de la fase móvil. En este estudio el cromatógrafo líquido usa como sistema de detección un equipo ICP-MS, basado en una propiedad del soluto (Gomis, 2008).

2.1.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

En cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil, un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna (Skoog *et al.*, 2007).

La muestra se inyecta mediante una jeringa en una cámara de vaporización, lugar donde se gasifica la muestra; después, es arrastrada hacia la columna por el gas inerte. En la cromatografía de gases se usa como fase estacionaria un compuesto orgánico polimérico funcionalmente similar al analito (polaridad similar), de baja volatilidad y reactividad, estable térmicamente y con adecuadas condiciones de disolvente (Skoog *et al.*, 2007).

Un cromatógrafo de gases frente a un HPLC presenta las siguientes ventajas (Snyder, Kirkland&Dolan, 2011):

- ❖ Dispone de detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama).
- ❖ Los métodos son más simples, y más sensibles que a los correspondientes a la cromatografía líquida de alta resolución.
- ❖ La instrumentación de un GC es más sencilla y económica.

Sin embargo, en la cromatografía de gases, la temperatura tiene una alta influencia sobre la distribución del equilibrio, por esto la GC presenta algunas limitaciones frente al HPLC:

- ❖ No pueden ser separados componentes que tienen una volatilización sobre los 300°C, por lo que la GC no aplica para muestras de elevados puntos de ebullición.
- ❖ No es útil para compuestos no volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a.
- ❖ No apto para compuestos termolábiles, los cuales son sensibles a altas temperaturas incluso de manera moderada (compuestos de interés biológico).
- ❖ También se dificulta la separación de compuestos que se encuentran en su forma iónica, puesto que en general son poco volátiles.

La cromatografía de gases es considerada más eficiente que el HPLC (valores más altos de los platos teóricos N), lo que significa que es posible separaciones más rápidas y/o mejores (Snyder *et al.*, 2011). Por esta razón, la cromatografía de gases es utilizada cuando los componentes de la mezcla son

volátiles o semivolátiles y térmicamente estables, y en caso que la mezcla no sea volátil se puede recurrir al proceso de derivatización, con el fin de obtener compuestos volátiles.

Un cromatógrafo de gases está formado por las siguientes partes principales (González, 2012):

Gas portador

Es un gas inerte que no reacciona con los componentes de la muestra, su función es transportar las moléculas volátiles del soluto a través de la columna sin tener influencia en los procesos de absorción o de partición; los gases más habituales son: nitrógeno, helio e hidrógeno.

Sistema de inyección de muestra

Tiene como objetivo vaporizar la muestra e incorporarlo al efluente del gas portador en dirección a la columna, consiste de un bloque metálico caliente en cuyo interior se encuentra el sistema de inyección; se inyecta la muestra a través de una micro jeringa que perfora una membrana (*septum*) y después se mezcla con el gas portador en una cámara de mezcla (*liner*).

Horno y Columna

La columna se encuentra enrollada dentro de un horno termostatzado a temperatura controlada, es un tubo de un material inerte, dentro del cual se encuentra la fase estacionaria. La cual puede ser un sólido activo (cromatografía gas sólido), o un líquido depositado sobre las partículas de un soporte sólido (cromatografía gas líquido).

Detector

El detector indica la elución de un componente en la muestra, produce una señal proporcional a la cantidad de analito que lo atraviesa. En análisis molecular se utilizan los detectores: conductividad térmica, ionización de llama, captura electrónica, nitrógeno-fósforo, fotométrico de llama, fotoionización y conductividad electrolítica, mientras que para el análisis elemental se usa equipos de espectrometría atómica, como en este estudio el ICP-MS.

2.2. TÉCNICAS ACOPLADAS

El término técnicas acopladas fue introducido por primera vez por Hirschfeld en los años 80s, lo define como dos o más instrumentos que actúan de forma automática y conjunta, integrados en una unidad o bien a través de una interface, cuya misión es armonizar las limitaciones de la señal de salida de uno de los instrumentos, con las limitaciones de la señal de entrada del otro. De acuerdo a esta definición, una de las principales ventajas de los métodos acoplados es que el tratamiento de la muestra, la separación y la detección, pueden llevarse a cabo en un sistema único. Este término se refiere generalmente a la combinación de una técnica de separación cromatográfica con un detector elemental sensible y específico (de absorción, emisión o masas) (Lobinski&Szpunar, 2007). Otras ventajas que se obtiene de los estos acoplamientos son (Pallavi&Shilpa, 2013):

- ❖ Mayor grado de sofisticación, mayor información, sensibilidad y selectividad.

- ❖ Proveen excelente eficiencia de separación y adquisición de información complementaria selectiva de un pico de interés en un LC o un GC.
- ❖ Mayor grado de automatización y exactitud.
- ❖ Mayor optimización de la muestra.
- ❖ Reducción de contaminación debido al sistema cerrado conformado.

El interés del análisis de especies fue impulsado en la comunidad analítica por los cromatógrafos de gases, lo cuales fueron los primeros en apreciar las ventajas de un detector selectivo elemental a mediados de los años 60s (Lobinski&Szpunar, 2007). Los siguientes sistemas fueron elaborados: GC-AAS (Cromatografía de Gases- Espectrometría de Absorción Atómica), GC-AES (Cromatografía de Gases- Espectrometría de Emisión Atómica), GC-MS (Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas) o GC- ICP- MS- TOF (Cromatografía de Gases- Plasma Acoplado Inductivamente- Espectrometría de Masas- Espectrometría de Tiempo de Vuelo). En contraste a la cromatografía de gases, los sistemas con cromatografía líquida se tardaron en aparecer en el mercado por razones tecnológicas, como el HPLC- ICP- MS (Michalskiet *al.*, 2011).

2.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

La Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) es una poderosa técnica analítica que proporciona información multielemental, isotópica y estructural; de manera rápida, precisa y exacta para determinar y cuantificar la mayoría de elementos de la tabla periódica a niveles

traza en un amplio rango dinámico lineal de 9 órdenes de magnitud (ng/L - mg/L) y con muy bajos límites de detección (Cuesto, 2013).

El esquema de un ICP-MS se indica en la Figura 1, básicamente está formado por una antorcha de plasma y un espectrómetro de masas de cuadrupolo conectados entre sí por una interface.

El ICP-MS combina dos propiedades analíticas que lo convierten en un potente detector en el campo del análisis de trazas. La primera es la obtención de una matriz libre de interferencias debido a la alta eficiencia de ionización del plasma de argón y, por otra parte, presenta una alta relación señal-ruido, característico en las técnicas de espectrometría de masas (Cuesto, 2013).

La inyección de la muestra se realiza mediante un sistema nebulizador (muestras líquidas) o ablación láser (muestras sólidas) (Skoog *et al.*, 2007). El sistema de inyección líquido consigue la atomización por efecto Venturi; la muestra entra al dispositivo por medio de una bomba peristáltica. Una vez atomizada la muestra, entra al plasma de argón acoplado inductivamente (formado por la acción de un campo magnético oscilante en un flujo de argón), el cual se encuentra a temperaturas aproximadamente de 8.000 - 10.000 K. Los iones del plasma de argón y electrones poseen energías cinéticas extremadamente elevadas que ionizan la mayoría de analitos con una eficiencia de más del 90%. De este modo, la estructura de los analitos es destruida completamente y solo se forman iones elementales monopositivos (M^+) que son transferidos a través de un cono de muestreo y luego a un segundo cono denominado separador (*skimmer*) (Cuesto, 2013).

Después estos iones monocargados son acelerados y enfocados a través de un sistema óptico, para ser conducidos hacia el orificio de entrada del analizador de masas (generalmente cuadrupolo), donde los iones son separados de acuerdo a su relación masa / carga. Finalmente, los iones alcanzan al detector multiplicador de electrones (Mothes&Mattusch, 2014).

2.3.1. INSTRUMENTACIÓN

En la actualidad, existe una amplia variedad de diseños y marcas comerciales que proveen equipos ICP-MS. Independientemente del tipo de equipo, un ICP-MS básicamente está formado por los siguientes componentes: nebulizador, cámara de nebulización, antorcha, conos de interface, bombas de vacío, óptica de iones, analizador de masas y detector.

➤ NEBULIZADOR Y CÁMARA DE NEBULIZACIÓN

La introducción de muestra en el ICP es un proceso crítico, debido a que depende de los siguientes factores: estado físico de la muestra, matriz de la muestra (interferencias), concentración de los analitos, precisión y exactitud requerida y cantidad de muestra disponible. Frecuentemente las muestras se introducen en estado líquido, como en el caso del efluente proveniente del HPLC o la muestra podría ser gaseosa como en el caso de la cromatografía de gases, cuyo efluente es dirigido directamente a la antorcha (Sperling, 2015).

Si se trata de una muestra líquida, ésta es aspirada y conducida a través de una bomba peristáltica a un nebulizador, donde se genera un aerosol de gotas de tamaño pequeño, pero de amplio rango (1 - 100 μm) (Linge&Jarvis, 2009).

El aerosol formado en el nebulizador, se genera como consecuencia de la interacción entre una corriente líquida y otra gaseosa, este proceso no es adecuado por su amplio rango de tamaño de gota, por lo que es transportado a una cámara de nebulización, este sitio actúa como un filtro de tamaño y de velocidad de la gota, elimina las gotas grandes porque si llegasen a la antorcha podrían causar problemas analíticos. En la cámara de nebulización se consigue un adecuado aerosol, con un tamaño de gota de 1 - 7 μm y pequeños gradientes de velocidad entre gotas (Linge&Jarvis, 2009).

➤ **FUENTE DE IONIZACIÓN: ANTORCHA**

Después de la obtención del rocío, la muestra es vaporizada, atomizada y finalmente ionizada en un plasma acoplado inductivamente, proceso que tiene lugar en una antorcha. Generalmente ésta es de cuarzo, debido a que soporta elevadas temperaturas, posee elevada resistencia al ataque químico y a altos niveles de radiación electromagnética a longitudes de onda que se extienden a la región ultravioleta (10 nm – 400 nm); la antorcha consiste básicamente de tres tubos concéntricos(Linge&Jarvis, 2009).

El gas nebulizador, el cual transporta los analitos al plasma, fluye en el tubo central o tubo inyector. El gas auxiliar fluye tangencialmente del tubo inyector y ajusta la posición horizontal del plasma axial relativo a la antorcha. Un tercer flujo, el gas refrigerante o gas plasma, fluye tangencialmente a través del tubo exterior, sirve como gas primario del plasma para enfriar las paredes interiores de la antorcha, centrar y estabilizar el plasma (Linge&Jarvis, 2009).

Se inicia la ionización del Ar con una fuente energética auxiliar (chispa Tesla). La ionización originada de esta forma se mantiene mediante la acción de una corriente alterna de alta frecuencia (27,1 – 40 MHz), que fluye a través de una bobina de inducción, la cual se encuentra en un extremo de la antorcha. Esta corriente da lugar a la formación de una corriente oscilante dentro de la bobina, lo que origina un intenso campo electromagnético a la salida de la antorcha, cuyas líneas de fuerza se encuentran orientadas axialmente a la bobina; dicho campo induce a los iones y a los electrones a moverse en orbitas circulares. Las corrientes eléctricas que se generan se cortocircuitan y provocan la continuidad del plasma para estos dos caminos: 1) Choque de iones y electrones con las moléculas del gas, 2) Calentamiento del gas por efecto Joule. La reacción en cadena de ionización termina en la transformación del gas argón en plasma (Linge&Jarvis, 2009). Las reacciones que se producen en la formación del plasma son las siguientes:



Una vez formado el plasma argón, el proceso de ionización de la muestra desde que entra al sistema se esquematiza en la Figura 2.

El plasma se define como un gas parcialmente ionizado conductor de la corriente eléctrica, oscila entre una temperatura de 8.000 - 10.000 K. En su composición se encuentra una concentración de iones y electrones relativamente alta (Skoog *et al.*, 2007).

➤ INTERFACE

El objetivo de la interface es transportar los iones producidos a presión atmosférica en la fuente de ionización (plasma) al alto vacío (10^{-5} - 10^{-6} Torr) del espectrómetro de masas.

Esto se logra utilizando una interface que consiste de dos conos metálicos, el espacio entre ellos se mantiene a una presión intermedia (10^{-2} Torr) mediante una bomba rotatoria, sitio conocido como cámara de expansión (Linge&Jarvis, 2009).

El primer cono, conocido como cono de muestreo es hecho de níquel con un orificio pequeño (< 1.0 mm) en el centro, está conectado a sistemas disipadores de calor, este cono tiene como objetivo enfriar y succionar el plasma dentro de la cámara de expansión. En esta región se forma una corriente de iones que se expande, tomando la forma de un cono de plasma enfriado. Una fracción del gas pasa al segundo cono conocido como separador (*skimmer*), el cual es generalmente más pequeño y puntiagudo que el cono muestreador. El cono *skimmer* también tiene un orificio mucho más pequeño (0,4 - 0,8 mm), su función es permitir que solo la línea de iones cercanos al eje del cono formado durante la expansión pase a la zona de lentes iónicas (Linge&Jarvis, 2009; Skoog *et al.*, 2007).

➤ LENTES IÓNICAS

Los iones excitados en la interface pasan a un sistema de lentes iónicas, el cual consiste de una o más lentes, hechos de una serie de platos metálicos, barras o cilindros, cargados positivamente y mantenidos a una presión de vacío

de aproximadamente 10^{-3} Torr con una bomba turbomolecular(Linge&Jarvis, 2009).

Se aplica una diferencia de potencial a las lentes para lograr dos objetivos con mínima discriminación de masa:

- ❖ Transportar el máximo número de iones de la interface al espectrómetro de masas, mientras rechaza en lo posible otros componentes de la matriz. Puesto que la elevada concentración de los elementos matriz comparados con el analito, es uno de los factores que contribuye a una baja eficiencia en la transmisión de iones, provocando un efecto de desenfoque del haz de iones. Podría producirse un efecto de espacio-carga, particularmente si los iones de la matriz son más pesados que los iones de los analitos (Linge&Jarvis, 2009).
- ❖ Retener las especies no iónicas como partículas, especies neutras, y fotones. Estas especies no iónicas podrían causar inestabilidad de la señal e incrementar los niveles de ruido de fondo, por ende, afectando el funcionamiento del sistema.

Se evita que las especies no iónicas alcancen el detector, usando barreras físicas, posicionando el detector de masas fuera de eje relativo al haz de iones o desviando electrostáticamente los iones en un ángulo de 90° en el analizador de masas. También algunos sistemas de lentes, incorporan una lente de extracción después del cono *skimmer* para “empujar” electrostáticamente los iones de la región de interface. Esto ayuda a mejorar la transmisión de iones y los límites de detección de los elementos de baja masa, los cuales tienden a ser expulsados fuera del haz iónico por elementos más pesados (Linge&Jarvis, 2009).

Por lo tanto, un buen diseño de lentes iónicas tiene la capacidad de producir una respuesta estable en la señal en todo el rango de masas, niveles de ruido de fondo bajos y buenos límites de detección.

➤ **CELDA DE REACCIÓN / COLISIÓN**

Algunos equipos de ICP-MS incorporan una celda de colisión / reacción (CRC), donde atraviesa el haz resultante de iones positivos para remover o atenuar interferencias poliatómicas e interferencias espectrales ocasionadas por el argón, en su modo de colisión; mientras que disocia y forma especies secundarias, en el modo de reacción (Michalski *et al.*, 2011).

Como se puede ver en la Figura 3, la celda se localiza antes de analizador de cuadrupolo a una presión (10^{-5} - 10^{-6} Torr). Los iones salen de la zona de interface y entran a la celda, un gas de colisión / reacción como el hidrógeno o el helio es inyectado en la celda, la cual consiste de un multipolo: cuadrupolo (4 barras), hexapolo (6 barras) u octapolo (8 barras), usualmente operado en el rango de las radiofrecuencias (RF). Este campo de radiofrecuencias no separa las masas como un cuadrupolo tradicional, sino que enfoca el haz de iones para que colisionen o reaccionen con el gas inyectado. Estas reacciones ocasionan que las especies interferentes se conviertan en especies no interferentes, o que el analito se convierta en otro ion sin interferencias. Tras esto los iones pasan al analizador de cuadrupolo para la separación de masas (Agilent, 2010).

El modo de colisión usa un gas inerte (helio) y un proceso llamado discriminación de energía cinética (KED, KineticEnergyDiscrimination) para atenuar selectivamente las interferencias poliatómicas de acuerdo a su tamaño.

La discriminación de energía cinética se basa en el hecho de que todos iones poliatómicos son más grandes que los iones analito de misma masa, entonces colisionan con la celda de gas en vez de atravesar la celda, saliendo con una energía residual menor. Estos iones con baja energía son excluidos del haz de electrones por un voltaje al final de la celda (Linge&Jarvis, 2009).

El modo de reacción usa gases reactivos (He / H_2 , NH_3 , O_2 , CH_4) y puede remover interferencias muy eficientemente. Las interferencias poliatómicas son mucho más reactivas que el analito, por lo que este modo se basa en la reacción de la especie interferente con el gas reactivo, permitiendo su posterior eliminación. También se da ocasiones en que el analito es más reactivo y resulta una nueva especie a una masa diferente (Agilent, 2010).

El uso de la celda de reacción / colisión y la KED es universal porque no necesita ninguna configuración específica para el analito o matriz, lo cual es ventajoso debido a que la mayoría de veces no se conoce la composición de la matriz de cada muestra (Agilent, 2010). Sin embargo, los gases de reacción no son adecuados para el análisis multielemental en matrices complejas y de alta variabilidad, debido a que reducen significativamente la sensibilidad de otros elementos (Becker & Jakubowski, 2009).

➤ **ESPECTRÓMETRO DE MASAS: ANALIZADOR DE MASAS DE CUADRUPOLO**

El espectrómetro de masas separa los iones monocargados (M^+) de acuerdo a sus relaciones de masa y carga, de manera que el detector es un contador de iones (Becker y Jakubowski, 2009). El analizador de masas se

encuentra entre la óptica de iones y el detector, mantenido a una presión de aproximadamente 10^{-6} Torr con una bomba turbomolecular adicional a la usada en el sistema de lentes. Diferentes tipos de analizadores de masas son combinados con la fuente de ICP para la separación del haz de iones, pero todos tienen un mismo objetivo; separar los iones de interés de otros analitos monocargados, matriz, solventes, y iones argón (Linge&Jarvis, 2009).

El cuadrupolo es el analizador de masas más frecuentemente utilizado con la fuente de ionización ICP, otros analizadores comunes son el sector magnético de doble enfoque con colector simple y múltiple, y el analizador de tiempo de vuelo (Ramyalakshmi,Venkatesh, Hepcy, Ravindra,Archana&Manjuvani, 2012)

El cuadrupolo o filtro de masas consiste en cuatro barras hiperbólicas paralelas y equidistantes de la misma longitud y diámetro, que sirven como electrodos del filtro de masas. Están hechos generalmente de acero inoxidable o molibdeno y algunos están cubiertos de cerámica para resistir la corrosión. El cuadrupolo usado en el ICP- MS tiene una longitud aproximada de 15 - 20 cm, y cerca de 1 cm de diámetro, y opera a una frecuencia de 2 - 3 MHz (Linge&Jarvis, 2009).

Los iones provenientes de la fuente de ionización son acelerados por un potencial de 5 - 15 eV e introducidos en el espacio entre las barras. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo y el otro par a la terminal negativa, en una fuente variable de corriente directa (DC). Simultáneamente, a cada par de barras diagonales, se aplica potenciales oscilantes de corriente alterna en el rango de radiofrecuencias (RF) de la misma amplitud, pero de signo opuesto, es decir, con un desfase de 180° (Linge y Jarvis,

2009). Se debe seleccionar la relación óptima entre RF / DC en cada par de barras, para que los iones de masa seleccionada atraviesen las barras al detector, mientras los otros iones inestables son expulsados del cuadrupolo (Linge&Jarvis, 2009).

Debido a que cada ion tiene una frecuencia propia que depende de su masa, solo aquellos iones que tienen frecuencia resonante (coincidente) con la del cuadrupolo pueden atravesarla, ya que en este caso no presentan la deflexión por el campo. Los iones con masa específica que entran en resonancia alcanzan a conservar su trayectoria estable y a cruzar el espacio cuadrupolar, sin sucumbir por choques con las barras metálicas; al salir del analizador de masas, finalmente la corriente eléctrica de estos iones se mide en un detector multiplicador de electrones (Linge&Jarvis, 2009).

La mayoría de analizadores de cuadrupolo tienen un amplio rango de masas, usualmente hasta 1.000 m/z, para los instrumentos de investigación están disponibles hasta 4.000 m/z. Las ventajas de éste analizador es su bajo costo en relación al analizador de sector magnético, facilidad de uso, velocidad de escaneo (<100 ms), lo que es particularmente útil para realizar barridos de picos cromatográficos a tiempo real y con alta eficiencia de transmisión. Sus desventajas son su menor sensibilidad y resolución (500 - 1000) respecto al analizador de sector magnético, instrumento donde al variar la intensidad de un campo magnético es posible enfocar sucesivamente iones con diferente relación masa/carga, lo que permite lograr un poder de resolución entre 1000 - 2000 y determinar la masa nominal de un ion (Cueto, 2013).

➤ DETECTOR

El detector convierte los iones en pulsos eléctricos, los cuales luego son cuantificados usando su sistema de circuitos integrados. La magnitud de los pulsos eléctricos corresponde al número de iones del analito presentes en la muestra, la cual es luego usada para la cuantificación de elementos traza por comparación de la señal iónica con una de calibración o de estándares de referencia.

El detector en ICP-MS es usualmente un multiplicador de electrones, los cuales funcionan generando una cascada de electrones secundarios a partir del impacto de un ion en el detector, generando una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de impactos de iones del analito, la cual es medida y relacionada con la concentración del analito (Skoog *et al.*, 2007). Tiempo atrás se usaba el multiplicador de electrones de Channeltron (CEM, siglas en ingles), fue usado en los primeros instrumentos ICP-MS, actualmente este ha sido reemplazado con detectores de dinodo discreto.

Una vez que los iones han sido separados de acuerdo a su relación masa/carga, pasan al detector de dinodo discreto, el cual usa un alto potencial negativo en su superficie para atraer la carga de los iones cargados positivamente, posee de 14-24 dinodos individuales. Una vez que el ion golpea la superficie activa del detector o primer dinodo, un número de electrones secundarios se liberan, y son atraídos por un segundo dinodo positivamente cargado, donde más electrones son emitidos. El proceso de emisión de electrones continua en esta manera a través de los dinodos individuales, amplificando la señal (Skoog *et al.*, 2007).

Los detectores de dinodo discreto generalmente poseen rangos dinámicos más amplios que los CEMs de 8 órdenes de magnitud, lo cual es importante en ICP-MS así como la concentración analizada puede variar de ppt a ppm gracias a que el detector de dinodo discreto también puede funcionar en dos modos, modo de pulso y modo análogo, el primer modo se usa en señales de baja intensidad (menos de 2×10^6 cps) medidos en cuentas por segundo mientras que el segundo modo es útil en señales de alta intensidad donde se mide en voltajes, siendo necesario factores de conversión para transformar del modo análogo al modo de pulsos, esta doble funcionalidad ayuda a evitar la necesidad de una elución de muestra adicional y protege al detector de una señal muy alta (Skoog *et al.*, 2007).

2.3.2. INTERFERENCIAS

Una interferencia es cualquier componente distinto a la especie de interés, la cual puede interferir en la determinación correcta del analito, ocasiona un error sistemático producto de una señal distorsionada. En las fuentes de plasma se producen menores interferencias que en las fuentes de llama, gracias a las elevadas temperaturas alcanzadas en la antorcha (Cueto, 2013), no obstante existen dos tipos de interferencias que se pueden presentar en un ICP-MS: Interferencias espectroscópicas e interferencias no espectroscópicas:

➤ INTERFERENCIAS ESPECTROSCÓPICAS

Las interferencias espectroscópicas que se pueden presentar en el ICP-MS pueden ser causadas por solapamientos isobáricos, iones poliatómicos, iones de óxido e hidrógeno, e iones con carga doble.

❖ INTERFERENCIAS ISOBÁRICAS

Las interferencias isobáricas se producen por la presencia de dos elementos con isótopos con la misma masa efectiva o cuya diferencia de masa no puede ser discriminada por el cuadrupolo (Linge&Jarvis, 2009). En general, las dos masas pueden diferir en menos de una unidad de masa. Con una resolución de 0,005 m/z del cuadrupolo, no se puede discriminar estas pequeñas diferencias de masa. Otros analizadores de masas, pueden tolerar diferencias más pequeñas, como un sistema de resolución de doble enfoque de masas.

El isótopo más abundante de un elemento con frecuencia es el que tiene solapamiento isobárico, por ende, se tiene que escoger el segundo isótopo más abundante. Por ejemplo, el 40Ar^+ se solapa con el pico más abundante del calcio, 40Ca^+ (97%), entonces se utiliza el segundo isótopo más abundante, 44Ca^+ (2,1%). Los instrumentos más modernos poseen un software adecuado que realiza predicciones de los posibles solapamientos isobáricos, realizando correcciones automáticas de dichas interferencias (Skoog *et al.*, 2007).

❖ INTERFERENCIAS DE IONES POLIATÓMICOS

Estas interferencias son más críticas que los solapamientos isobáricos y son las interferencias con más incidencia. Los iones poliatómicos son especies moleculares formadas en el plasma con la misma relación m/z a los analitos de interés, por ende, se solapan con los isótopos del analito.

Los iones poliatómicos son formados por interacciones de las especies del plasma (Ar, H, O, N y C) y las especies de la matriz de la muestra, solventes,

ácidos usados en la preparación de la muestra (N, S, Cl), y gases atmosféricos introducidos. Estas interferencias pueden corregirse usando un blanco o escogiendo un isótopo diferente del analito.

❖ INTERFERENCIAS DE ÓXIDO E HIDRÓXIDO

Estas interferencias se producen por el vapor de agua introducido en el plasma. Los óxidos e hidróxidos se forman a partir del mismo analito, de los componentes de la matriz, y de disolventes (Skoog *et al.*, 2007).

Casi todas las especies forman iones MO^+ y MOH^+ , donde M representa el analito o el elemento de la matriz (Skoog *et al.*, 2009).SEXTA EDICION

❖ IONES CON CARGA DOBLE

Estas interferencias se forman por la pérdida de dos electrones en vez de uno, produciéndose especies M^{2+} en el plasma, éstas interferencias son comunes en elementos con un segundo potencial de ionización bajo, como elementos alcalino térreos, elementos de transición y tierras raras (Linge&Jarvis, 2009). El cuadrupolo separa los iones en relación a su m/z , así un ion doblemente cargado tendrá la masa $M/2$, por ejemplo, el $^{136}Ba^{2+}$ se solapa con $^{68}Zn^+$.

Tanto la formación de óxidos como de iones con doble carga dependen de las condiciones de ionización del plasma, el cual debe ser cuidadosamente optimizado cambiando el flujo del gas de nebulización y energía de RF (Linge y Jarvis, 2009).

En instrumentos ICP-MS actuales la formación de éstas interferencias, pueden disminuirse o, en algunos casos, eliminarse completamente, con la celda

de reacción/colisión ubicada entre las lentes iónicas y el analizador de cuadrupolo (Linge&Jarvis, 2009).

En la Tabla 2, se muestran las posibles interferencias para los isótopos más importantes de mercurio, arsénico y cromo.

➤ **INTERFERENCIAS NO ESPECTROSCÓPICAS**

Las interferencias no espectroscópicas también se denominan efecto matriz, las cuales se distinguen por un aumento o una disminución en la señal del analito (Linge&Jarvis, 2009).

Este efecto tiene relación directa con la naturaleza de la matriz, la cual puede afectar varios procesos en el ICP-MS como la producción del aerosol, producción de iones, extracción iónica a través de la interface, y transmisión del haz iónico positivo a través del espectrómetro de masas. Las interferencias no espectroscópicas son complejas y difíciles de mitigar (Fraser&Beauchemin, 2009).

Existen varias estrategias para minimizar los efectos de matriz interferentes:

- ❖ La muestra puede ser diluida a tal punto que la concentración total de elementos matriz esté bajo el límite de la interferencia. En muchos casos, dicha dilución podría ser tolerada y los límites de detección aún ser adecuados; sin embargo, la dilución empeorará relativamente el ruido de fondo con respecto a la señal del analito.
- ❖ Usando el método de adición estándar, se debe escoger la misma matriz de la muestra para los estándares de calibración. Esta medida no es muy

problemática si en la matriz hay predominantemente uno o dos elementos, por lo que no es aconsejable para muestras muy complejas.

- ❖ En el ICP-MS se puede utilizar la metodología de dilución isotópica, donde se utiliza patrones internos (sustancias análogas al analito), pero con una abundancia isotópica alterada, denominados comúnmente trazadores o “*spikes*”. La dilución isotópica consiste en añadir cantidades conocidas de estos trazadores a la muestra a analizar, de esta forma “diluye” el enriquecimiento isotópico del estándar, este método es considerado como de alta precisión (Cueto, 2013).
- ❖ Los efectos de la matriz también pueden ser eliminados utilizando un estándar interno, para compensar pequeñas cantidades de supresión de sensibilidad. Generalmente, un buen estándar interno en un ICP-MS, es un elemento el cual tiene masa y energía de ionización cercano a la del analito.
- ❖ Un recurso final es separar la matriz de los analitos, mediante diferentes métodos de extracción (Linge&Jarvis, 2009).

2.3.3. COMPARACIÓN DEL ICP-MS CON OTRAS TÉCNICAS DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

Las técnicas de espectrometría atómica, incluyen Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS, siglas en ingles), Espectrometría de Absorción Atómica de Horno de Grafito (GFAAS, siglas en ingles), Plasma Acoplado Inductivamente con Espectrometría de Emisión Óptica (ICP-AES, siglas en ingles) y Plasma Acoplado Inductivamente con Espectrometría de Masas (ICP-MS, siglas en inglés) (Thermo Elemental, 2011).

En la Tabla 3, se presenta una comparación del ICP-MS con las técnicas anteriormente mencionadas, si bien es cierto cualquiera de éstas técnicas podría funcionar como detector para formar un sistema de especiación. Sin embargo, los acoplamientos con ICP-MS son más fáciles y frecuentes, debido a la sencilla forma de conexión entre la salida de la columna cromatográfica al sistema de introducción de muestra (flujo líquido) o directamente a la antorcha (flujo gaseoso) del ICP-MS (Sperling, 2015).

El ICP-MS cuenta con excelentes límites de detección para la mayoría de elementos solo comparados con los obtenidos con GFAAS, y superiores en comparación al ICP-AES. Posee un amplio rango dinámico (10^9) mayor a cualquier otra técnica, capacidad de análisis multielemental al igual que el ICP-AES. El ICP-MS posee modos para eliminar las interferencias químicas como ninguna otra técnica y capacidad de análisis isotópico. Estas ventajas hacen del ICP-MS la mejor opción de detección en el análisis de especiación, a pesar del elevado costo de adquisición y mantenimiento, y relativamente baja tolerancia a los sólidos disueltos (Thermo Elemental, 2011).

CAPÍTULO 3. SISTEMAS DE ESPECIACIÓN LC-ICP-MS Y GC-ICP-MS

3.1. REQUERIMIENTOS PARA EL ACOUPLE LC O GC CON ICP-MS

Todos los sistemas de acoplamiento a ICP-MS requieren de las siguientes condiciones (Sperling, 2015):

- ❖ La interface de conexión (línea de transferencia) debe transmitir la fracción de la muestra cuantitativamente del sistema de separación al plasma del ICP-MS de una forma tal que el plasma lo pueda tolerar.
- ❖ La resolución temporal de los componentes de la muestra no tiene que ser degradada de manera inaceptable durante la transferencia al plasma.
- ❖ El ICP-MS debe ser capaz de adquirir una señal transitoria a una suficiente frecuencia de muestreo y sobre un suficiente rango dinámico para acomodar la resolución del cromatógrafo al número requerido de elementos o isótopos por pico sobre sus rangos de concentración.
- ❖ Se debe ajustar el plasma del ICP-MS bajo condiciones similares a las encontradas durante la corrida cromatográfica.
- ❖ Si la muestra es gaseosa, como en GC, la línea de transferencia tiene ser calentada, y debe terminar directamente en la antorcha del ICP-MS, con el fin de evitar en lo posible la degradación y condensación de la muestra.
- ❖ Si la muestra es líquida, la línea de transferencia terminará en el nebulizador para generar un aerosol compatible con el plasma. Esto puede requerir un modo de flujo dividido (*split*) o un gas auxiliar (*make up*), para

hacer coincidir el flujo cromatográfico con los requerimientos del nebulizador y plasma del ICP-MS.

3.2. ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA A ESPECTROMETRÍA DE PLASMA-MASAS

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) acoplada a ICP-MS en la detección elemental es la técnica más ampliamente utilizada para el análisis de especiación, el esquema de dicho sistema se ve en la Figura 4.

En un principio el acoplamiento de cromatografía líquida con ICP-MS tuvo dificultades debido al gran volumen de disolvente que tenía que soportar el plasma argón. Ya que un alto contenido de disolvente orgánico, mejora la separación de LC convencional. En la actualidad este acoplamiento es más sencillo, al reducir al mínimo la carga de eluente, mediante el uso de micro nebulizadores e incluso nano nebulizadores que pueden aceptar el efluente de columnas capilares y nano columnas respectivamente (Lokitset *al.*, 2009). El HPLC ofrece gran variedad de posibilidades para la separación de las especies de interés, como: intercambio iónico, afinidad, exclusión por tamaño, apareamiento iónico y cualquier otra de las numerosas técnicas de fase inversa (Michalskiet *al.*, 2011).

El sistema LC-ICP-MS tiene importantes ventajas para el análisis de especiación:

- ❖ Complejos cromatogramas se pueden simplificar como simples “elementogramas”; es decir, es posible obtener picos simples de cada especie elemental de interés para su determinación cualitativa o cuantitativa.

- ❖ Es factible la cuantificación de especies elementales no conocidas con respecto al elemento de interés, gracias a la sensibilidad independiente del componente sin necesidad de tener estándares (Sperling, 2015).

3.2.1. INTERFACE

Acoplar un cromatógrafo líquido con un ICP-MS resulta relativamente sencillo, puesto que se debe conectar la salida de la columna con el nebulizador mediante una manguera de transferencia. Esta simplicidad, ha hecho que el acoplamiento de cromatografía líquida al ICP-MS sea el sistema de especiación más usado, por eso, alrededor del 75% de todas las publicaciones relacionadas a técnicas de acoplamiento con ICP-MS hacen referencia a LC-ICP-MS (Sperling, 2015).

La conexión entre la salida de la columna y el sistema de introducción de muestra del ICP, usualmente nebulización neumática convencional, se realiza mediante un tubo generalmente de politetrafluoroetileno (PTFE) u otro material plástico inerte. La longitud y el diámetro interno de la línea de transferencia debe ser mínimo, empleándose una longitud de 20 - 50 cm y 1,5 mm de diámetro interno, para asegurar que el ensanchamiento de los picos cromatográficos sea mínimo (Sperling, 2015).

3.2.2. AJUSTE Y OPTIMIZACIÓN

El ajuste del ICP-MS requiere del ajuste de las siguientes condiciones operacionales (Duarte, 2006):

- ❖ El plasma para una adecuada producción de iones (ajuste de la intensidad de la señal para los iones M^+ , ajuste para una mínima producción de iones MO^+ e iones M^{2+}).
- ❖ El tipo de nebulizador que se adapte a la carga de flujo proveniente de la columna.
- ❖ La posición de la antorcha para mejorar la sensibilidad.
- ❖ La celda de reacción (si tiene) para la óptima remoción de interferencias.
- ❖ El analizador de cuadrupolo para la resolución y calibración de masa.
- ❖ El detector para la sensibilidad y rango dinámico lineal óptimo.

Estas tareas son simplificadas y automatizadas en equipos modernos. El último modelo de la casa comercial Agilent es el equipo 8900 ICP-MS, formado por un triple cuadrupolo en modo tándem MS-MS, a través de la celda de reacción/ colisión ORS4 con gas helio contrala muy eficientemente la remoción de interferencias, lo cual incrementa la sensibilidad y disminuye el ruido de fondo. Gracias a un nuevo detector electro multiplicador se puede alcanzar 11 órdenes de rango dinámico lineal. Los límites de detección de este modelo son muy bajos incluso para elementos difíciles como S, Si y P, No siendo suficiente este equipo posee un potente software, el cual simplifica el trabajo del analista al automatizar el desarrollo de métodos, y poder controlar el avance del análisis mediante un celular inteligente (Agilent, 2017).

En la optimización del cromatógrafo líquido se debe tomar en cuenta el tipo de elución (gradiente o isocrática), el ajuste de pH, la velocidad de flujo y concentración de la fase móvil, cuyos parámetros pueden ser estudiados con una solución estándar de cada especie del analito a analizar (Duarte, 2006).

3.3. ACOPLAMIENTO DE CROMATOGRAFÍA DE GASES A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE

La cromatografía de gases (GC) sólo es aplicable para especies volátiles térmicamente estables y compuestos organometálicos (Sperling, 2015), a menudo se prefiere este tipo de cromatografía frente a la cromatografía líquida, ya que proporciona mayor resolución cromatográfica con mínima señal de fondo; el disolvente se separa de los analitos y el gas portador es usualmente helio.

Si un análisis requiere una elevada resolución, a veces es preferible realizar derivatizaciones para crear componentes volátiles a partir de especies no volátiles. Sin embargo, el acoplamiento de GC a ICP-MS no es tan sencillo como en LC, debido al riesgo de que los componentes del efluente cromatográfico se condensen por lo que se requiere de una línea de transferencia termostatzada.

Cuando se usa el ICP-MS como detector de GC (Figura 5), éste provee varias ventajas sobre si se usara detectores elementales tradicionales (Sperling, 2015):

- ❖ El ICP-MS es casi universal. Elementos como el hidrógeno, helio, flúor, y neón no pueden ser medidos directamente debido a que sus potenciales de ionización son mayores al argón del plasma.

- ❖ El ICP-MS puede tolerar un amplio rango de gas portador (*carrier*) y flujos de GC.
- ❖ El ICP-MS permite la calibración de componente independiente, lo cual es útil cuando los estándares son costosos o no están disponibles.
- ❖ El ICP-MS no sufre supresión de respuesta del analito por la coelución de los componentes.
- ❖ El ICP-MS es capaz de cuantificar mediante dilución isotópica.

3.3.1. INTERFACE

La interface entre el GC y el ICP-MS consiste en un calentador de acero inoxidable, una línea de transferencia inerte de sílice y una antorcha especial con un tubo inyector caliente. El gas *make up* (Ar) es calentado previamente dentro del horno cromatográfico donde está montado el calentador de acero inoxidable. Luego se agrega este gas al efluente de la columna, al inicio de la línea de transferencia para arrastrar a los analitos (la línea de transferencia es eléctricamente calentada a 300 °C para ayudar a mantener a los componentes en fase gaseosa), evitando su condensación o puntos fríos. De ésta manera, la muestra se mantiene a temperatura elevada constante desde el final de la columna cromatográfica al inyector del ICP (Durazo, 2015; Sperling, 2015).

3.3.2. AJUSTE Y OPTIMIZACIÓN

A diferencia del acoplamiento con cromatografía líquida, en la cromatografía de gases la introducción de la muestra al ICP-MS no es un aerosol húmedo, por lo que la optimización de este sistema es algo diferente de las típicas

condiciones de plasma húmedo. Primero, porque ni agua ni ácidos son introducidos, y las interferencias poliatómicas, particularmente óxidos, son mayoritariamente eliminadas; segundo, sin la introducción de agua, mucha menos potencia de plasma es requerida para lograr una ionización completa, incluso de elementos de alto potencial de ionización. Generalmente, el rendimiento óptimo es alcanzado cuando la potencia de plasma se ajusta entre 600 a 800 watts (McSheehy&Sperling, 2009). El ajuste de una potencia más alta de plasma es ocasionalmente usado cuando se requiere mayor flujo de gas portador, el cual reduce la temperatura del plasma.

En el ajuste del GC-ICP-MS, se debe usar una muestra de ajuste gaseosa. Normalmente, esto se logra a través de la adición de 0,05% - 0,1% de xenón en helio o argón al gas portador o al gas *make up* (Ar). El xenón está compuesto de 9 isótopos con masas entre 124 y 136, con un rango de abundancia relativa de aproximadamente 0,1 a 26%, lo que le permite proveer de numerosos puntos de ajuste. A parte que este gas puede ser introducido con el gas portador de GC, también es útil en la optimización de las posiciones horizontales y verticales de la antorcha, lo cual es crítico para la optimización de la sensibilidad, debido al estrecho diámetro del inyector de la antorcha de GC (Sperling, 2015).

Adicionalmente, si el xenón es introducido con el gas portador del GC, puede ser usado como estándar interno para monitorear y corregir alguna deriva en la respuesta del ICP-MS. Si un amplio rango de masas es requerido, otros gases de ajuste pueden ser utilizados, o alternativamente, con masas de fondo 38 y 78. Por ejemplo, una aplicación común de GC-ICP-MS es el análisis de especies de azufre en combustibles de hidrocarburos. En este caso, usando una

mezcla de 0,1% de sulfuro de hidrógeno en helio, se obtiene un gas ideal en el que se puede optimizar la sensibilidad del sulfuro (McSheehy&Sperling, 2009).

Además del uso del gas xenón para el ajuste, la adición de otros gases al plasma puede tener beneficios. Adicionando una pequeña cantidad de oxígeno, se podría prevenir depósitos de carbono en los componentes de la interface del ICP-MS (principalmente los conos), producidos por la oxidación del carbón elemental a óxidos de carbono volátiles. Los gases opcionales nitrógeno y oxígeno, han mostrado mejorar la sensibilidad para varios analitos elementales comunes, incluyendo estaño, arsénico y selenio. Estos gases son típicamente introducidos a través de un soporte, un conector en la línea del gas make up, en el punto donde la columna de GC entra en la línea de transferencia (McSheehy&Sperling, 2009).

El flujo puede ser controlado por el flujo de masa auxiliar en el ICP-MS o por un flujo de masa opcional del GC. Por ejemplo, es a veces útil encender el oxígeno al inicio de la corrida para controlar la formación de carbono durante el pico del solvente, para luego apagarlo durante el transcurso de la corrida, previniendo así interferencias de azufre. La prolongada exposición al oxígeno puede reducir el tiempo de vida de los conos de níquel, por lo que el uso de conos de platino es a veces recomendado en este tipo de situaciones (Sperling, 2015).

3.4. APLICACIONES DE LOS SISTEMAS DE ESPECIACIÓN: LC-ICP-MS Y GC-ICP-MS

3.4.1. COMPARACIÓN DE TÉCNICAS ACOPLADAS A CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE MERCURIO

En este trabajo se comparó diferentes acoplamientos con cromatografía de gases: espectrómetro de masas (MS), espectrómetro de fluorescencia atómica (piro-AFS) e ICP-MS, en el análisis de especiación de mercurio (Hg^{2+} y MetHg) de dos materiales de referencia certificados (MRCs) de tejidos biológicos. En los tres casos las muestras fueron tratadas mediante extracción microondas, luego se realizó una etilación acuosa con el agente de derivatización tetraetil borato de sodio (NaBEt_4) y se utilizó helio como gas portador (*carrier*). Las técnicas fueron evaluadas principalmente según su límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, repetitividad y reproducibilidad (Nevado *et al.*, 2011).

Resultados

Los resultados respecto a los límites de detección y límites de cuantificación estuvieron en el rango de 2 - 6 pg para GC-piro-AFS, 1 - 4 pg para GC-MS, y 0,05 - 0,21 pg para GC-ICP-MS. La linealidad estuvo en el rango de 5 a 200 $\mu\text{g/L}$ para las especies de GC-piro-AFS y GC-MS y en el rango de 0,25 a 10 $\mu\text{g/L}$ para GC-ICP-MS.

La precisión fue determinada al correr una solución estándar de 50 $\mu\text{g/L}$ de las especies de mercurio en GC-piro-AFS y GC-MS, y de 5 $\mu\text{g/L}$ para GC-ICP-MS,

cada una en 10 repeticiones; los resultados mostraron una desviación estándar relativa (RSD) menor al 5% para ambos sistemas. La exactitud se evaluó con las mismas soluciones estándar usadas para la determinación de la precisión en réplicas de 10 en dos días diferentes; la $RSD < 5\%$, por lo que no hay diferencia significativa en las determinaciones en ambos días.

La separación de las dos especies de mercurio fue alcanzada en menos de 5 minutos para los tres sistemas; no obstante, en GC-ICP-MS se obtuvo la elución de ambas especies en menos de 2 minutos.

Las diferencias en el rendimiento cromatográfico entre los sistemas, principalmente se debió a la configuración del GC. Por ejemplo, en GC-MS y GC-piro-AFS se usó una columna *normal-bore* (0,25 mm D.I) y en GC-ICP-MS una columna *wide-bore* (0,53 mm D.I), en este último implica un mayor flujo de gas portador. El rendimiento de éstas técnicas fue evaluado al analizar los materiales de referencia certificados de músculo de pescado (DOLT-3) e hígado de pescado (DORM-2). Los MRCs fueron previamente sometidos a extracción microondas con hidróxido de tetra-metil amonio (TMAH), y luego a derivatización llevada a un pH de 3,9 con NaBEt₄. Los cromatogramas obtenidos para MetHg y Hg²⁺ en tejidos de pescado usando etilación acuosa se muestran en la Figura 6.

Discusión de resultados

El sistema de especiación GC-ICP-MS mostró los mejores límites de detección. Sin embargo, todos los sistemas fueron lo suficientemente sensibles y selectivos para la especiación de mercurio en muestras biológicas, GC-MS y GC-ICP-MS tienen la capacidad de ofrecer análisis isotópico con dilución isotópica

(ID), y GC-piro-AFS fue la alternativa menos costosa. La desviación estándar de las áreas de MetHg y Hg²⁺ fue menor del 5 % para los tres sistemas. Los sistemas GC-ICP-MS y GC-piro-AFS, brindan un alto grado de especificidad elemental y son relativamente libres de interferencias.

La principal ventaja de GC es la transferencia cuantitativa de los analitos de la columna al detector sin la necesidad de pasar por nebulización, lo que significa un aumento en el límite de detección con respecto a LC. Una pequeña desventaja es que se debe derivatizar las especies de mercurio iónico para cambiar su naturaleza como volátil mediante etilación. Los mejores resultados fueron obtenidos con GC-ICP-MS debido a su capacidad de análisis multielemental simultáneo y la posibilidad de usar el análisis de dilución isotópica. Su principal desventaja es el costo instrumental y operacional, además de requerir personal cualificado para operar este equipo complejo.

3.4.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN CABELLO POR HPLC-ICP-MS

En el presente trabajo se aplicó un sencillo procedimiento de extracción de mercurio en muestras de cabello, para su posterior análisis de especiación mediante HPLC-ICP-MS, el objetivo fue cuantificar la cantidad de mercurio inorgánico (iHg), metilmercurio (MetHg) y etilmercurio (EtHg). Las muestras fueron recogidas de una comunidad de la Amazonía Brasileira (5 muestras de 5 voluntarios), cuyo antecedente es un elevado consumo de pescado. Para esto se pesó exactamente 50 mg de muestra de cabello, luego se agregó una solución

extractora de mercaptoetanol, L-cisteína y HCl, y se sometió a un baño de ultrasonido durante 10 minutos. Después de la extracción, para el análisis se utilizó una columna en fase reversa C₁₈ con una fase móvil que contiene 0,05% de mercaptoetanol, 0,4% m/v de L-cisteína, 0,006 mol/L de acetato de amonio y 5% v/v de metanol (Souza, Rodrigues, De Oliveira & Barbosa, 2009).

Resultados

La cuantificación de las especies de mercurio en cabello se basó en la altura del pico por calibración externa. Se usó soluciones madre de mercurio inorgánico, cloruro de metilmercurio y cloruro de etilmercurio, para preparar las soluciones estándar en un rango de 0,0 a 20,0 mg/L, diluidas con la solución móvil. Los resultados presentados en la Tabla 4, muestran la presencia solo de mercurio inorgánico y metilmercurio. Se probó que la exactitud del método es mayor al 95%, mediante el uso de materiales de referencia certificados de cabello humano (MRC 085 y MRC 086).

Discusión de resultados

Un método sencillo de preparación de muestra fue aplicado con éxito para el análisis de especiación de mercurio en muestras de cabello, se buscó simplificar el proceso de preparación de muestra debido a que en estudios anteriores se mostró que un tratamiento de muestra complejo es muy invasivo. Se encontró que la digestión alcalina genera contaminantes (Liang & Lazoff, 1999) y podría darse una interconversión entre las especies de mercurio durante el tratamiento de muestra (Qvarnstrom & Frech, 2002).

En el análisis se encontró que el elevado contenido de metilmercurio tiene relación directa con la ingesta de pescado en la comunidad amazónica. Sin embargo, la población de muestras no es representativa, con un número de solo cinco, lo que podría representar un error estadístico.

Al comparar el contenido total de mercurio en cada muestra, siendo la combinación de mercurio inorgánico y metilmercurio, con el mercurio total de las mismas muestras analizadas por espectrometría de absorción atómica por vapor frío, se podría decir que no existe diferencia significativa. No obstante, la mayoría de métodos analíticos solo distinguen entre mercurio inorgánico y mercurio total, usándose una diferencia aritmética para conocer el contenido de mercurio orgánico. El análisis por CV-AAS no se podría llamar estrictamente especiación; sería más correcto describirla como fraccionamiento. Por lo tanto, es esencial una técnica de especiación como es el acoplamiento de HPLC con ICP-MS, que pueda separar e identificar las formas químicas de mercurio para estudiar sus riesgos toxicológicos.

3.4.3. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE MERCURIO EN AGUA DE MAR MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GC-ICP-MS

En este estudio se investigó métodos para la cuantificación de mercurio y metilmercurio en agua de mar usando SPME-GC-ICP-MS, con el objetivo de obtener límites de detección menores a 1 ng/L para ambas especies. Las muestras de agua fueron recogidas de cuatro lugares diferentes de la costa de Gijón y Avilés (España), las muestras se colocaron en viales de teflón con la adición de HNO₃ al 1% para conservar las especies de mercurio. Luego se

procedió a filtrar en un tamaño de poro de 0,45 μm y se ajustó el pH a 5,4 con una solución buffer de ácido acético/acetato de sodio. Para la micro extracción en fase sólida, se tomó 3 mL de muestra, 1 mL de buffer y 0,2 mL de la solución derivatizante tetra-propil borato de sodio (NaBPr_4) o NaBEt_4 en un vial con agitación magnética durante 3 minutos. Se llevó a un volumen de 5 mL con agua extra pura, finalmente la fibra del SPME se introdujo en el espacio cabeza del vial durante 5 minutos, después de este tiempo la fibra se contrajo e inmediatamente fue insertada en el sistema de inyección del cromatógrafo de gases para su desorción térmica y análisis por GC-ICP-MS. Las condiciones instrumentales de SPME-GC-ICP-MS se muestran en la Tabla 5 (Bravo, Vicente, Costa, Pereiro & Sanz, 2004).

Resultados

En experimentos iniciales en el análisis de agua de mar con SPME-GC-ICP-MS se usó calibración externa, la cual presentó concentraciones de las especies de mercurio mucho más bajas que aquellas obtenidas por una técnica previamente validada (Bravo *et al.*, 2001). Dicha supresión de señal, evidencia la existencia de un efecto matriz en el proceso de derivatización, por lo que se optó por la estandarización interna con cloruro de etilmercurio. La metodología de adición estándar también se usó en paralelo.

La contaminación de los blancos fue el factor limitante para obtener el límite de detección deseado ($<1 \text{ ng/L}$). Este problema afectó principalmente al mercurio inorgánico, se solucionó con el desarrollo de un procedimiento de limpieza, el cual consistió en usar mini columnas (5 cm x 5 mm) empacadas con

8-hidroxiquinolina para atrapar y remover las trazas de mercurio presentes en todos los reactivos analíticos usados.

Los límites de detección de ambos analitos y de ambos agentes derivatizantes se muestran en la Tabla 6. También, se muestra la linealidad para cada especie, así como la precisión, y la desviación estándar relativa de los factores respuesta.

Discusión de resultados

El elevado contenido de sales en las muestras de agua produjo un efecto matriz, disminuyendo la señal analítica. Si bien la eliminación o reducción de los iones interferentes puede reducirse por procesos químicos, estos podrían afectar la cantidad de mercurio inicial, afectando los resultados. La razón de esta disminución, es que la eficiencia de los derivatizantes para la etilación y propilación es significativamente menor en presencia de sales, entonces se optó por la calibración mediante adición estándar la cual resultó ser confiable en la cuantificación de las especies de mercurio. El simple uso de un estándar interno no fue suficiente para compensar el efecto matriz. Además, el tratamiento de limpieza de los reactivos permitió que la concentración de mercurio en los blancos sea casi despreciable, esto hizo que la contaminación de los blancos ya no sea un impedimento para obtener bajos límites de detección.

Se obtuvieron límites de detección muy bajos tanto para metilmercurio como para mercurio inorgánico de 0,11 ng/L y 1,6 ng/L respectivamente, mediante etilación, mientras que se obtuvieron límites de 0,17 ng/L y 0,35 ng/L mediante propilación. La derivatización de las especies de mercurio con tetra-propil borato

de sodio, dio mayor rendimiento, probablemente debido a que posee menor contaminación de mercurio que el tetra-etil borato de sodio comercial.

Esta metodología permitió el análisis en un tiempo relativamente corto, entre la preparación de muestra y el análisis pasaron aproximadamente 25 minutos, además se requirió de muy poca muestra (3 mL), esto hace de SPME-GC-ICP-MS una técnica acoplada realmente útil para la especiación de mercurio a niveles extremadamente bajos (<1 ng/L LD).

3.4.4. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ORINA MEDIANTE HPLC-ICP-MS

La toxicidad y carcinogenicidad de cada especie de arsénico depende de su forma, el arsénico en el aire y agua de consumo humano se encuentra en forma de arsénico inorgánico (iAs), mientras que los mariscos contienen altos niveles de compuestos organoarsénicos como arsenobetaina (AsBe), ácido dimetil arsínico (DMA), arsenocolina (AsCho), y arsenoazúcares (AsSugs). El DMA y sus derivados se consideran como los menos cancerígenos, mientras AsBe y AsCho carecen de efectos tóxicos y cancerígenos.

En este estudio se buscó conocer la concentración de las especies de arsénico en orina mediante la técnica acoplada HPLC-ICP-MS, las muestras fueron tomadas de 210 japoneses sin exposición ocupacional a este metaloide. Dichos individuos previamente respondieron un cuestionario acerca de sus hábitos alimenticios, debido a que la comida japonesa incluye grandes cantidades de mariscos en su dieta, siendo la comida una fuente mayor de arsénico que el agua. Estudios de especiación de arsénico de este tipo se han hecho previamente

con espectrometría de absorción atómica (AAS) con digestión alcalina; sin embargo, los AsSugs fueron medidos como DMA y TMA, AsBe y, AsCho como trimetilarsina (TMA). El sistema HPLC-ICP-MS puede medir directamente estas especies sin pretratamiento, lo que permite obtener con exactitud los bioindicadores de exposición a arsénico.

Las muestras de orina recogidas fueron almacenadas en tubos de plástico a -80°C antes del análisis. Estas fueron diluidas 10 veces con agua ultra pura y fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue usado para el análisis. El material de referencia certificado NIES CRM No.18 (orina humana) fue usado para validar el procedimiento usado para el análisis.

Los componentes se separaron en una columna cromatográfica de resina de intercambio catiónico, con una fase móvil compuesta de 5mM HNO₃, 6mM NH₄NO₃, 1,5 mM 2,6-ácido piridindicarboxílico, con un flujo de 1,0 mL/min, a 40°C de temperatura, y volumen de inyección de 50µL(Hataet *al.*, 2007).

Resultados

En la Tabla 7 se muestra los resultados del análisis del material de referencia (NIES CRM N°18), el cual está certificado para As total, DMA y AsBe, dichos valores se encontraron dentro del rango de tolerancia dado por el fabricante del material de referencia, esto confirma la exactitud del sistema HPLC-ICP-MS.

Se analizó una solución estándar de 10 µg/L As, la cual contiene As III, As V, MMA, DMA, AsBe, AsCho, TMAO; como se puede observar en la Figura 7, el pico de AsCho se solapó con el pico de tetrametilarsonio, y la concentración de

óxido de trimetilarsina (TMAO) se encontró a niveles de traza (información no mostrada), por ello estos picos se denominaron como “otros”. La categoría otros, incluye compuestos dimetilarsénicos como metabolitos de AsSugs.

En la Tabla 8, se puede ver los valores medios de las especies de arsénico de las 210 muestras de orina, las especies de arsénico con la mayor concentración en orina fue de AsBe, seguido de DMA. Ambas especies son cerca del 40 al 30% de la media del As total, respectivamente, mientras que el iAs es menos del 2%. El valor medio de creatinina urinaria fue 1,3 g/L. Por lo que se presentan también los valores ajustados con la creatinina, la concentración de DMA y AsBe fue significativamente mayor en individuos que prefieren mariscos a los que prefieren consumir carne. Ninguno de los otros valores varía significativamente entre ambos grupos.

Discusión de resultados

El presente estudio mostró que la técnica HPLC-ICP-MS puede realizar análisis de especiación de arsénico con gran exactitud, se consiguió identificar elevadas concentraciones de componentes de arsénico orgánico en individuos sin exposición laboral al arsénico, compuestos inherentes al consumo de mariscos.

Las concentraciones en orina son usualmente presentadas usando los valores netos o los valores ajustados a la creatinina. No se encontró reportes indicando cuál de los valores debe ser usado; sin embargo, en este estudio se usó ambos. Los individuos que prefieren comida de mar presentaron elevados niveles de DMA en relación de aquellos que consumen carne. Por lo tanto, el

análisis de especiación es necesario para conocer el riesgo de salud que podría conllevar la exposición de arsénico en la alimentación.

Puesto que el arsénico en los mariscos se encuentra principalmente en su forma menos tóxica, arsénico orgánico, se debería considerar el agua de consumo humano y los cultivos regados con agua contaminada como la fuente principal de intoxicación, debido a que posee la forma más peligrosa de arsénico, arsénico inorgánico. La exposición prolongada a esta forma de arsénico produce lesiones cutáneas y cáncer.

3.4.5. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ARROZ INTEGRAL MEDIANTE HPLC-ICP-MS

Este estudio se realizó en Japón, previamente se conoce que en este país el consumo de mariscos y arroz es elevado; no obstante, como se pudo ver en el estudio anterior, la mayor parte del arsénico encontrado en organismos marinos se encuentra en forma orgánica, especies poco tóxicas o nada tóxicas para el ser humano. Por ello, es importante la especiación de arsénico en arroz debido a que por su forma de cultivo tiene la capacidad de absorber arsénico tanto de las aguas de riego como del suelo.

Se obtuvo cinco muestras de arroz integral con concentraciones conocidas de arsénico como parte de una prueba interlaboratorios. La preparación de las muestras consistió en agregar 10 mL de agua ultra pura a 0,1 g de arroz molido, esta mezcla fue calentada durante 4 horas a 90°C y finalmente filtrada a través de un tamaño de poro de 0,45 µm. Los estándares fueron una mezcla de DMA, MMA, As (III) y As (V); también, se agregó AsBe como estándar interno. Las

condiciones de operación del HPLC y del ICP-MS se muestran en la Tabla 9(Kobayashi&Shikino, 2010).

Resultados

En la Tabla 10 se muestra los límites de detección y límites de cuantificación de cada especie de arsénico, y los resultados obtenidos en el análisis de cinco muestras de arroz integral. Se encontró mayor concentración de mercurio inorgánico, un promedio de 0,172 mg iAs/Kg arroz, en relación al mercurio orgánico, el ácido mono-metil arsónico (MMA) es prácticamente inexistente. La concentración de cada componente se determinó a través de la medición del área de cada pico. Los resultados del estudio de interlaboratorios mostraron buena correlación en todas las muestras para las cinco especies.

Se sabe que puede haber varias interferencias poliatómicas como ArCl^+ y CaCl^+ cuya m/z es coincidente con el arsénico m/z 75, por lo que fue necesario utilizar en el ICP-MS la celda universal con gas metano para remover dichas interferencias poliatómicas a través del modo reacción química.

Discusión de resultados

La mayoría de arsénico en organismos marinos se presenta en forma de arsenobetaina, la cual no es tóxica. No en tanto, existen grandes cantidades de consumo de arroz en Japón, es así que es importante conocer las formas de arsénico que están presentes en el arroz. A través del estudio interlaboratorio de las muestras de arroz integral de composición conocida, se probó la precisión del método y la aptitud de eliminar interferencias poliatómicas por el equipo a través

de la celda universal. Es importante hacer una selección correcta del gas de reacción/colisión de la celda, por ejemplo el uso del gas helio podría disminuir la sensibilidad del método, por tanto se resolvió utilizar otro gas opcional como es el metano. Por tanto, el sistema HPLC-ICP-MS con la correcta elección de condiciones instrumentales tiene la capacidad de separar y cuantificar de manera muy sensible todas las especies de arsénico a nivel de trazas con precisión y exactitud.

3.4.6. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN JUGO DE MANZANA MEDIANTE HPLC-ICP-MS

El arsénico puede infiltrarse naturalmente en las manzanas a través del medio ambiente o antropológicamente por el uso de pesticidas. Por ello en el 2013, la USFDA propuso un nivel de acción de 10 µg/L de arsénico inorgánico en el jugo de manzana. Esto implica realizar análisis de especiación, para conocer las especies de arsénico, que podrían afectar el bienestar sobre todo de los niños.

En este estudio se utilizó siete muestras de jugo de manzana comercial y fueron filtradas a través de un poro de 0,45 µm. Las mediciones se realizaron mediante calibración externa con estándares entre 0,1- 15 µg/L, para las especies de As (III), As (V), MMA y DMA. Todos los estándares fueron preparados con los componentes de la fase móvil. Las condiciones instrumentales del HPLC y del ICP-MS se muestran en la Tabla 11 (Ernstberger & Neubauer, 2012).

Resultados y discusión de resultados

Se examinó el efecto matriz del jugo de manzana sin dilución, al comparar los cromatogramas del jugo de manzana enriquecido con 2 µg/L de todas las especies de arsénico y un estándar de 2 µg/L preparado con los componentes de la fase móvil, como se muestran en la Figura 8. Estos cromatogramas indicaron que casi no existe efecto matriz, solo hubo una leve variación del tiempo de retención del As (III). Para probar la estabilidad del método a corto plazo se realizó inyecciones consecutivas de una de las muestras de jugo de manzana durante 30 minutos y para el largo plazo se hizo inyecciones de estándares de 2µg/L y 10 µg/L cada 30 minutos durante ocho horas, con porcentajes de RSD menores al 6%, lo que demuestra la gran estabilidad del equipo.

Mediante el método de calibración externa, se realizó el análisis de especiación de arsénico en las siete muestras de jugo de manzana, cuyos resultados se muestran en la Tabla 12. Estos resultados indicaron que todas las muestras tienen niveles mayores de arsénico inorgánico que de arsénico orgánico, pero valores muy por debajo del nivel de acción de 10 µg/L.

Por el momento no existe materiales de referencia certificados de las especies de arsénico en jugo de manzana, para medir la exactitud de este método, por lo que se enriqueció cada muestra con estándares a dos niveles de concentración: 2 µg/L (nivel bajo) y 10 µg/L (nivel de acción). Las recuperaciones estuvieron dentro del $\pm 10\%$, por lo que se comprueba la exactitud de éste método.

Mediante el acoplamiento de un HPLC en fase reversa a un ICP-MS, se logró realizar el análisis de especiación de las formas de arsénico en muestras de jugo de manzana en un tiempo corto de solo 3 minutos por corrida, encontrándose

ambas especies de arsénico inorgánico (As III y As V) y una forma de arsénico orgánico (DMA) y en algunas muestras (MMA); con muy buena exactitud, estabilidad del método y de las especies con una sencilla preparación de muestra. Al comprobarse que prácticamente no existió efecto matriz en las muestras de jugo de manzana comercial, las muestras de jugo de manzana pudieron ser analizadas sin dilución.

3.4.7. ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN DE CROMO EN AGUA MEDIANTE HPLC-ICP-MS

En este trabajo se estudió diferentes parámetros para el análisis de especiación del cromo, puesto que el cromo existe en la naturaleza principalmente en dos formas, como cromo trivalente (Cr^{+3}) en forma catiónica, siendo un nutriente esencial y como cromo hexavalente (Cr^{+6}) en forma aniónica como cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), siendo tóxico. Un parámetro importante es la preservación de la muestra, puesto que puede haber una interconversión de la especie de mayor estado de oxidación a la especie de menor oxidación. Además, se propone condiciones cromatográficas para distinguir efectivamente entre Cr^{+3} y Cr^{+6} en muestras de agua. Las condiciones instrumentales del ICP-MS se muestran en la Tabla 13 (Neubauer, Reuter & Perrone, 2003).

Resultados

La separación se llevó a cabo en condiciones isocráticas con una columna en fase reversa (C_8) de fase iónica, usando como reactivo el hidróxido de tetra-

butil-amonio (TBAH) y la detección en un ICP-MS con celda de reacción dinámica (DRC). La fase móvil se realizó combinando TBAH, sal de EDTA y metanol y los estándares se realizaron a partir de soluciones madre 1000 mg/L de Cr^{+3} como $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y Cr^{+6} como $(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

El Cr^{+3} formó un complejo con EDTA y fue mayormente retenido en la columna. El Cr^{+6} en solución ocurre como anión dicromato. La carga neta negativa del complejo Cr^{+3} -EDTA y la carga negativa del dicromato interactúan con la carga positiva del TBAH. Luego los hidrocarburos del grupo tetrabutil interactúan con la fase estacionaria C_8 . El objetivo de agregar metanol fue asistir la elución de estas especies en la columna.

Se comparó el efecto de acondicionar una columna nueva C_8 en la separación de las especies de cromo. La columna se trató con metanol al 100% durante 90 min, y se evidenció que la columna sin tratamiento no permite una buena separación de los picos de las especies a diferencia de la columna acondicionada. Un pico desconocido eluyó al inicio del cromatograma, manifestándose únicamente cuando se utilizaba viales de polipropileno. Se realizó la misma comparación en el condicionamiento de una columna C_{18} , esta columna no fue adecuada para esta separación, debido a que no hubo una buena resolución de los picos.

Para conocer el efecto del material de los viales sobre la preservación de las especies, se realizó inyecciones consecutivas de un estándar con ambas especies (10 $\mu\text{g/L}$) en viales de polipropileno. Como se ve en la Figura 9, a medida que el tiempo avanzó el pico de Cr^{+6} disminuyó mientras el pico de

Cr^{+3} aumentó, esto significa que existió una interconversión de Cr^{+6} a Cr^{+3} , pero no viceversa.

El mismo procedimiento de inyecciones consecutivas de una mezcla estándar de las especies se realizó con viales de vidrio en reemplazo de los viales de polipropileno, donde se observó que la intensidad de los picos se mantiene constante, sugiriendo que no existe interconversión de especies a diferencia que si se usara viales de polipropileno.

Una importante interferencia poliatómica en la determinación de cromo es $40\text{Ar}^{12}\text{C}^{+}$, debido a que solapa a la señal del isótopo más abundante del cromo (52Cr^{+}) a la misma $m/z=52$. El uso de metanol al 2% en la fase móvil amplifica esta interferencia. Para eliminar esta interferencia se usó el modo de celda de reacción dinámica (DRC) con NH_3 como gas de reacción. En la celda de reacción el amoníaco reaccionó con ésta interferencia eliminándola. Esto se ve en la Figura 10, donde se obtuvo dos cromatogramas con $1\text{ }\mu\text{g/L Cr}^{+3}$ y $1\text{ }\mu\text{g/L Cr}^{+6}$, uno sin gas de reacción en modo estándar y el otro con amoníaco como gas de reacción en el modo DRC. El cromatograma en modo estándar presentó un elevado ruido de fondo y una baja relación señal/ruido (S/N), además un pico desconocido se observa al inicio del cromatograma. A diferencia del cromatograma, donde se utilizó la celda de reacción dinámica, la línea base presentó menor ruido de fondo y la relación S/N fue alta.

Para determinar el límite de detección del cromo en modo DRC, se hicieron inyecciones sucesivas de $50\text{ }\mu\text{L}$ de diferentes concentraciones de cromo en la fase móvil. En la Figura 11, se muestra los cromatogramas de 25, 50 y 100 ng/L

de especies de cromo. La concentración de 50 ng/L tuvo una relación S/N de 3, por lo que el límite de detección para cada especie fue de 50 ng/L.

Para determinar el límite de cuantificación de cada especie, se realizó una calibración externa, inyectando 50 μL de 0.1, 0.5, 1.5, y 10 $\mu\text{g/L}$ de cada especie de cromo en la fase móvil. La regresión lineal de cada especie fue de 0.999, por lo que se demuestra la linealidad y reproducibilidad de la técnica. Luego una muestra de agua de grifo fue analizada, dicho cromatograma no presentó ningún pico, indicando un nivel extremadamente bajo de cromo, por lo que la muestra de agua de grifo debió ser enriquecida con 0,5 $\mu\text{g/L}$ de cada especie, en la Figura 12 se muestra el cromatograma del agua enriquecida y del estándar de calibración de 0,5 $\mu\text{g/L}$, los resultados dieron para Cr^{+3} = 0.62 $\mu\text{g/L}$ y para Cr^{+6} = 0,36 $\mu\text{g/L}$. Análisis subsecuentes dieron los mismos resultados; aunque, el Cr^{+6} se convirtió en Cr^{+3} después de la adición del estándar en la muestra. Para lograr minimizar esta conversión se probó con la dilución de la muestra en 5 veces con la fase móvil antes del enriquecimiento con las especies de cromo. En la Figura 13, se puede ver el cromatograma de la muestra enriquecida y diluida y el estándar de calibración de 0,5 $\mu\text{g/L}$. La conversión de Cr^{+6} a Cr^{+3} en la muestra enriquecida se vio minimizada, los picos coinciden más cerca con los de la calibración estándar. Los resultados de las muestras enriquecidas dieron Cr^{+3} = 0.57 $\mu\text{g/L}$ y Cr^{+6} = 0,47 $\mu\text{g/L}$, confirmando que la conversión se ha minimizado.

Discusión de resultados

El sistema de especiación HPLC-ICP-MS, demostró linealidad y reproducibilidad, para el análisis de las especies de cromo. No obstante, la interconversión de especies del cromo es un problema latente, ya que los resultados sugieren que algún compuesto desconocido presente en las muestras de agua ayuda a catalizar la conversión del cromo. Se logró obtener una menor interconversión de especies gracias a la dilución de la muestra, debido a que la especie que cataliza este cambio también se diluye.

Este sistema de especiación al incorporar una celda dinámica de reacción (DRC), fue posible eliminar cualquier interferencia de ArC^+ , aumentando la sensibilidad en la cuantificación. Además, en el modo DRC, desapareció el pico no identificado, por lo que se deduce que posiblemente se trataba de una interferencia compuesta de carbono.

3.4.8. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO Y CROMO (VI) POR HPLC-ICP-MS

En este estudio se realizó la determinación simultánea de As (III), As (V), ácido mono-metil arsónico (MMA), ácido di-metil arsínico (DMA) y Cr (VI), en aguas superficiales de las provincias de Castellón y Valencia (España), mediante el acoplamiento de HPLC de intercambio aniónico a un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente. Se tomaron seis muestras de agua superficial, fueron filtradas a través de una membrana de $0,45\ \mu\text{m}$, luego se inyectaron al cromatógrafo a través de un lazo de $100\ \mu\text{L}$. La separación se realizó mediante gradiente de la fase móvil NH_4HCO_3 a un pH de 8,0 a $1\ \text{mL/min}$,

la cuantificación se realizó por calibración externa. La columna fue conectada mediante una línea de transferencia de 35 cm de poliéter éter cetona (PEEK) (0,18 mm, D.I) al nebulizador del ICP (Roing, Martínez, López & Hernández, 2001).

Resultados

Con la correcta optimización de las condiciones cromatográficas y del ICP-MS, se logró la separación de las cinco especies en aproximadamente 9 minutos, usando un gradiente de elución, como se muestra en la Figura 14.

Se estudió la linealidad del método con estándares de 0,05-1000 µg/L para las especies de arsénico y 20-1000 µg/L para Cr (VI), cuyos resultados indicaron una excelente linealidad ($r=0,999$). Los límites de detección fueron de 0,02-0,05 µg As/L y 5,5 µg Cr/L. La repetitividad para las especies de arsénico fue de 2- 3% y mayor al 8% para la especie Cr (VI) debido al elevado ruido de fondo para estas especies.

Discusión de resultados

La cromatografía líquida de intercambio aniónico acoplado a un ICP-MS fue una forma rápida para la determinación simultánea de las especies de arsénico y cromo; As (III), As (V), DMA, MMA, y Cr (VI) en agua. Entre las dos formas existentes de cromo, se escogió analizar únicamente al Cr (VI) porque es conocido por su toxicidad mientras que el cromo (III) es inocuo.

Mediante la fase móvil de carbonato se alcanzó la separación de todas las especies, donde los límites de detección para las especies de arsénico fueron

menores a 0,05 µg/L; mientras que para el Cr (VI) fue mayor a 5 µg/L, el límite de detección elevado del cromo hexavalente pudo ser debido a la interferencia poliatómica asociada al análisis en el ICP-MS (ArC^+ a m/z 52 y 53) lo cual provoca un aumento el ruido en la línea base del elemento.

A pesar de los esfuerzos para el establecimiento de condiciones óptimas en la detección de especies de manera simultánea, es evidente la necesidad de profundizar investigaciones al respecto, desarrollar material de referencia adecuado y encontrar las condiciones metodológicas que permitan un análisis eficiente.

CAPÍTULO 4.CONCLUSIONES

1. La especiación elemental es útil cuando se desea conocer que especies contribuyen a la toxicidad de un elemento en particular, debido a que la concentración total de un elemento no brinda la información necesaria para esta tarea.
2. Las formas químicas de un elemento en particular varían de una matriz a otra, elevadas concentraciones de arsénico en mariscos es poco o nada dañino porque las principales especies presentes no son tóxicas como arsenobetaina, arsenocolina y arsenoazúcares. Mientras que si la matriz es arroz, aumenta la probabilidad de encontrar especies de arsénico tóxicas.
3. Las especies de un elemento pueden presentar diferentes características respecto a: biodisponibilidad, bioacumulación, biomagnificación, movilidad, persistencia, toxicidad, valor nutricional, volatilidad y reactividad.
4. El análisis de especiación es posible en una gran variedad de matrices, como: tejidos biológicos, aguas, orina, arroz, jugo de manzana, entre otros, siendo la toxicología el área de mayor aplicación para conocer de manera confiable los niveles de concentración de especies peligrosas o contaminantes, especialmente en el medio ambiente y alimentos, que podrían llegar a afectar al ser humano.
5. El análisis de especiación obtenido al acoplar una técnica cromatográfica (líquida o gaseosa) con un ICP-MS, brinda resultados con una excelente sensibilidad, precisión, exactitud, selectividad, robustez y bajos límites de detección (ng/L).

6. El ICP-MS se puede considerar entre los mejores detectores cromatográficos en el análisis de especiación, principalmente por su sencilla forma de acoplamiento.
7. La cromatografía de gases es la técnica de separación de elección para acoplar con el ICP-MS, porque permite el 100% de introducción de muestra.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se recomienda que laboratorios especializados en el análisis elemental de trazas, analizar la viabilidad del acoplamiento de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (LC-ICP-MS/GC-ICP-MS), como una herramienta potente en el análisis de especiación para una gran variedad de matrices, la cual brinda información más detallada de un elemento, a través de cromatogramas simples.
- ❖ Las técnicas tradicionales de espectroscopía atómica por si solas brindan únicamente información del elemento total, por lo que se recomienda el empleo de los sistemas de especiación con ICP-MS sobre todo porque es el único modo para analizar ciertas especies de manera confiable.
- ❖ Para implementar esta metodología en un laboratorio se recomienda que se tenga en cuenta si el número de muestras a analizar compensa el elevado costo de instrumentación y mantenimiento, capacitación de los analistas, complejidad del sistema y de los métodos analíticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agilenttechnologies. Collision/ReactionCell in ICP-MS [en línea]. USA:2010.Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/articlereprints/public/5990_5955EN%20HR.pdf [fecha de consulta: 29 de mayo del 2016].

Baralkiewiez, D., Pikosz, B., Belter, M.yMarcinkowska, M. Speciation analysis of chromium in drinking water samples by ion-pair reversed-phase HPLC–ICP-MS: validation of the analytical method and evaluation of the uncertainty budget. **Accreditation and QualityAssurance**, 18:391, 2013.

Boteco, M. Nadie responde por los intoxicados con arsénico en Tumbaco. El Universo. [en línea]. Ecuador: 2007. Disponible en: <http://www.eluniverso.com/2007/11/25/0001/12/B718E2BD179E4F7583F675D06C1AC782.html> [fecha de consulta: 10 de enero del 2017].

Bravo, L., Ruiz, J., Fidalgo, J. y Sanz, A. Mercury speciation analysis in sea water by solid phase microextraction–gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry using ethyl and propyl derivatization. Matrixeffectsevaluation. **Spectrochimica Acta Part B**, 59:59-66, 2004.

Bravo, L., Vicente, B., Costa, J., Pereiro, R. y Sanz, A. **Talanta**, 55:1071–1078, 2001

Castelo, M. **Determinación de Arsénico en agua de consumo del cantón Rumiñahui por Espectrofotometría de Absorción Atómica.** Tesis (Licenciatura en Ciencias Químicas). Quito, Ecuador, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2015, 54 p.

Cueto, S. **Desarrollo de metodologías de cuantificación de compuestos orgánicos basados en dilución isotópica en línea de carbono-13 y espectrometría de masas.** Tesis (Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural Avanzado). Oviedo, España, Universidad de Oviedo, 2013, 8 p.

Das, A., Guardia, M y Cervera, ML. **Literature survey of online elemental speciation in aqueous solutions.** **Talanta**, 55(1):1-28, 2001.

Duarte, F. **Determinação de espécies de arsênio por LC-ICP-MS** [en línea]. Tesis (Master en Química) Universidad Federal de Santa María,Brasil,2006. Disponible en:<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp026082.pdf>. [Fecha de consulta: 30 de diciembre del 2016].

Durazo, A.**The Environmental Applications of GC-ICP-MS.** Department of Chemical and EnvironmentalEngineering.TheUniversity of Arizona, USA, 2015.

Disponible en: <http://www.cosmoscience.org/blog/wp-content/uploads/2015/08/3-Durazo.pdf> .[Fecha de consulta: 30 de diciembre del 2016].

Ernstberger, H. y Neubauer, K. Accurate and Rapid Determination of Arsenic Speciation in Apple Juice. **PerkinElmer, Inc** [en línea]. USA, 2012. Disponible en: https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_Altus-HPLC-NexION-350-As-Speciation-In-Apple-Juice-012244_01.pdf.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias Comisión del Codex Alimentarius [en línea], 2015. [Fecha de consulta: 18 de abril del 2016]. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-10%252FWD%252Fcf10_15s.pdf.

García, J. **Estudio de productos de fisión y actínidos en combustibles nucleares irradiados mediante la técnica LA-ICP-MS (Ablación por láser-espectrometría de masas con fuente ICP)**. Universidad Complutense de Madrid, 69-83, 2000.

Gomis, V. **Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución** [en línea] ,2008. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/handle/10045/8248>, 3-9. [fecha de consulta: 13 de diciembre del 2016].

González, R. **Evaluación de un prototipo de línea de transferencia para el acoplamiento CG-ICP-MS con nebulización líquida simultánea** [en línea]. Tesis (Master en Ciencias Analíticas y Bio Análisis) .Departamento de Química Física y Analítica Universidad de Oviedo, España, 2012. Disponible en: http://dspace.sheol.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/4307/6/TFM_Ram%C3%B3n%20Gonz%C3%A1lez%20M%C3%A9ndez.pdf. [Fecha de consulta: 17 de diciembre del 2016].

Gray, P., Mindak, W. y Cheng. **Elemental Analysis Manual for Food and Related Products. Food and Drug Administration**, 1.1: 18, 2015.

Green Facts. Consejo Científico sobre el Mercurio [en línea]. 2002. Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/mercurio/mercurio-greenfacts.pdf> [fecha de consulta: 13 de junio del 2016].

Hata, A., Endo, Y., Nakajima, Y., Ikebe, M., Ogawa, M., Fujitani, N. y Endo, G. HPLC-ICP-MS Speciation Analysis of Arsenic in Urine of Japanese Subjects without Occupational Exposure. **Journal of Occupational Health**, 49:217-223, 2007.

ICP-MS Introduction [en línea]. Manchester: The University of Manchester. School of Earth and Environmental Sciences, 2016. Disponible en: <http://www.seaes.manchester.ac.uk/ourresearch/facilities/geochemistry/equipmentandfacilities/icp-ms/instrumentdescriptionandtheory/> [fecha de consulta: 1 mayo de 2016]

- Jablonska, M. Antimony, Arsenic and Chromium Speciation Studies in BiałaPrzemsza River (Upper Silesia, Poland) Water by HPLC-ICP-MS. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 12:4740, 2015.
- Li, Y., Chen, C., Li, B., Wang, Q., Wang, J., Gao, Y., Zhao y Chai, Z. Simultaneous speciation of selenium and mercury in human urine samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 22, 925, 2007.
- Linge, K y Jarvis, K. Quadrupole ICP-MS: Introduction to Instrumentation, Measurement Techniques and Analytical Capabilities. **Geostandards and Geoanalytical Research**, 33:445-510, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-908X.2009.00039.x.
- Lobinski, R. y Szpunar, J. RSC Chromatography Monographs: Hyphenated Techniques in Speciation Analysis. Cambridge, GB: **Royal Society of Chemistry**, 385:12-13, 2007.
- Ma M and Le XC. Efect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. **ClimChem**, 44: 539-550, 1998.
- McSheehy, S. y Sperling, M. Atomic perspectives: Hyphenated ICP-MS techniques for speciation analysis. **Spectroscopy**, 24(3): 14-16, 2009.
- Meyer, V. **Practical High Performance LiquidChromatography** [en línea] 5ta. Ed. Wiley, 2010. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470688427.ch24/summary> [fecha de consulta: 1 mayo de 2016].
- Michalski, R., Jabłonska, M., Szopa, S. y Łyko, A. Application of Ion Chromatography with ICP-MS or MS Detection to the Determination of Selected Halides and Metal/Metalloids Species. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 41(2):133-150, 2011.
- Mothes, S. y Mattusch, J. Practical Gas Chromatography-Helmholtz Centre for Environmental Research. Springer-**Verlag Berlin Heidelberg**, 15:351-370, 2014.
- Neubauer, K., Reuter, W. y Perrone, P. **Chromium Speciation in Water by HPLC/ICP-MS**.
- Pallavi, P., Shilpa, K. Review of Hyphenated Tecniques. **International Journal of Chemical.India**, 1(3) 157-158, 2013. ISSN: 2321-4902
- PerkinElmerLife and AnalyticalSciences** [en línea]. USA: 2003. Disponible en: http://www.perkinelmer.cl/download/APP_ChromiumSpectnInWater.pdf [fecha de consulta: 9 de junio del 2016].
- Nevado, J., Rodríguez, R., Krupp, E., Guzmán, F., Rodríguez, N., Jiménez, M., Wallace, D., Patiño, M. Comparison of gas chromatographic hyphenated

techniques for mercury speciation analysis. **Journal of Chromatography A**, 1218 (28): 4545-4551, 2011.

Nic, M. y Jirat, B. **Compendium of Chemical Terminology**. The Gold Book [en línea], 2, 2006. [Fecha de consulta: 18 de abril del 2016]. Disponible en: <http://goldbook.iupac.org>. ISBN 0-9678550-9-8.

Potter, D. A commercial perspective on the growth and development of the quadrupole ICP-MS market. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 23: 690–693, 2008.

PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). Evaluación Mundial para el Mercurio [en línea], 2005. [Fecha de consulta: 18 de abril del 2016]. Disponible en: <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Mercury/Documents/Publications/final-assessment-report-Nov05-Spanish.pdf>.

Quijano, M. **Desarrollo de métodos analíticos para la determinación de selenio y sus especies en muestras de alimentos, aguas, fluidos biológicos por ICP-MS**. Tesis (Doctorado en Química Analítica). Madrid, España, Universidad Complutense de Madrid, 2009, 29-45 p.

Qvarnstrom, J. y Frech, W. Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 17: 1486–1491, 2002.

Radboud University. ICP-MS. [en línea]. Holanda: 2016. Recuperado, de: <http://www.ru.nl/science/gi/facilities/elemental-analysis/icp-ms/> [fecha de consulta: 20 de mayo del 2016].

Ramos, P. Mercurio y Pescado. **Revista Ecologista**, 39, 2004.

Ramyalakshmi, G., Venkatesh, P., Hepcy, D., Ravindra, K., Archana, E., Manjuvani, S. A Review on Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy. **International Journal of Drug Development and Research**, 4(4):69-79, 2012.

Roing, A., Martinez, Y., López, F. y Hernández, F. Simultaneous determination of arsenic species and chromium (VI) by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 912:319-327, 2001.

Royal Society of Chemistry. Chromium uses and properties. [en línea]. USA: 2016. Recuperado, de: <http://www.rsc.org/periodic-table/element/24/chromium> [fecha de consulta: 07 de enero del 2017].

Sayago, A., Cameán, A; Repetto, M y Asuero, A. Importancia de la especiación de elementos en toxicología alimentaria. **Toxicología Alimentaria** [en línea]. Madrid, Díaz de Santos, 2012. Disponible en : <https://books.google.com.ec/books?id=AxPrCrzZ6yWC&pg=PA329&lpg=PA329&d>

q=elementos+de+interes+analisis+de+especiacion&source=bl&ots=uR4TztpD4Y&sig=o4kQ7k3HEscK7LA8oAQOOfbNiY&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwiJivax9bXSAhWGQSYKHU49AgoQ6AEIOTAE#v=onepage&q=elementos%20de%20interes%20analisis%20de%20especiacion&f=false [fecha de consulta: 4 de diciembre del 2016].

Séby, F., Gagean, M., Garraund, H. y Castetbon, A. Development of analytical procedures for determination of total chromium by quadrupole ICP–MS and high-resolution ICP–MS, and hexavalent chromium by HPLC–ICP–MS, in different materials used in the automotive industry. **Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 377:685-686, 2003.

Selin, N. Global biogeochemical cycling of mercury: a review. **Annual Review of Environment and Resources**, 34: 43–63, 2009.

Skoog, D., Holler, J. y Nieman, T. **Principios de Análisis Instrumental**. Sexta edición. USA: Thomson Higher Education, 2007. 269-285 p.

Snyder, L., Kirkland, J. y Dolan, W. **Introduction to modern Liquid Chromatography**. Tercera edición, Wiley, 2011. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=taurNJU0u2AC&oi=fnd&pg=PT11&dq=liquid+chromatography&ots=yaGIUnY-yw&sig=m6MWprCrt9HDgUMlyAugnugligM#v=onepage&q=liquid%20chromatography&f=false> [fecha de consulta: 30 de mayo de 2016].

Sperling, M. **Handbook of Hyphenated ICP-MS Applications** [en línea]. Segunda edición, USA, Agilent technologies, 2015. Disponible en: https://www.agilent.com/cs/library/applications/59909473EN_icpmsSpeciationHB_Ir.pdf [fecha de consulta: 23 de abril del 2016].

Souza, S., Rodrigues, J., De Oliveira, V. y Barbosa, F. A fast sample preparation procedure for mercury speciation in hair samples by high-performance liquid chromatography coupled to ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 25: 79–83, 2010.

Taylor, H. **Inductively Coupled Plasm-Mass Spectrometry. Practices and Techniques** [en línea]. USA: Academic Press, 2001. ISBN 0-12-683865-8.

Thermo Elemental. AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS? Which Technique should I use? Anelementaryoverview of elemental analysis [en línea] USA: 2011. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=536d29c3d3df3e447c8b45a2&assetKey=AS%3A273531932217348%401442226502426> ICP-MS compared with other techniques [fecha de consulta: 12 de junio del 2016].

Thomas, R. **Practical guide to ICP-MS** [en línea]. New York: Marcel Dekker, Inc, 2004. Disponible en: <http://algol.fis.uc.pt/jap/ICP-MS-Primer-Thomas.pdf> [fecha de consulta: 31 de mayo del 2016].

Tokumoto, M., Kutsukake, N., Yamanishi, E., Katsuta, D., Anan, Y. y Ogra, Y. Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase is a specific. **Journal of Toxicology Reports**, 1:589–590, 2014.

Tsuji, JS., Van Kerkhove, MD, Kaetzel, RS, Scrafford, CG., Mink, PJ., Barraj, LM., Crecelius, EA. y Goodman, M. **Evaluation of exposure to arsenic in residential soil. EnvironHealthPerspect**, 113: 1735-1740, 2005.

Waters. ACQUITY UPLC. [en línea] USA: 2017. Recuperado de: http://www.waters.com/waters/es_ES/ACQUITYUPLC/nav.htm?cid=10131966&locale=es_ES[fecha de consulta: 04 de julio del 2017].

Weemaels, N. **Estudio Sobre la Sociedad Civil del Ecuador. Comité Pro Agua sin Arsénico**[en línea], 2006. Disponible en: http://www.iepala.es/IMG/pdf/6_COMITE_PRO_AGUA_SIN_ARSENICO.pdf[fecha de consulta: 10 de enero del 2017].

Weinberg,J. Introducción a la Contaminación por Mercurio para las ONG. **International POPs elimination network**, 1: 9-32, 2010. Disponible en: http://ipen.org/sites/default/files/documents/ipen_mercury_booklet-es.pdf [fecha de consulta: 10 de diciembre de 2016]

FIGURAS

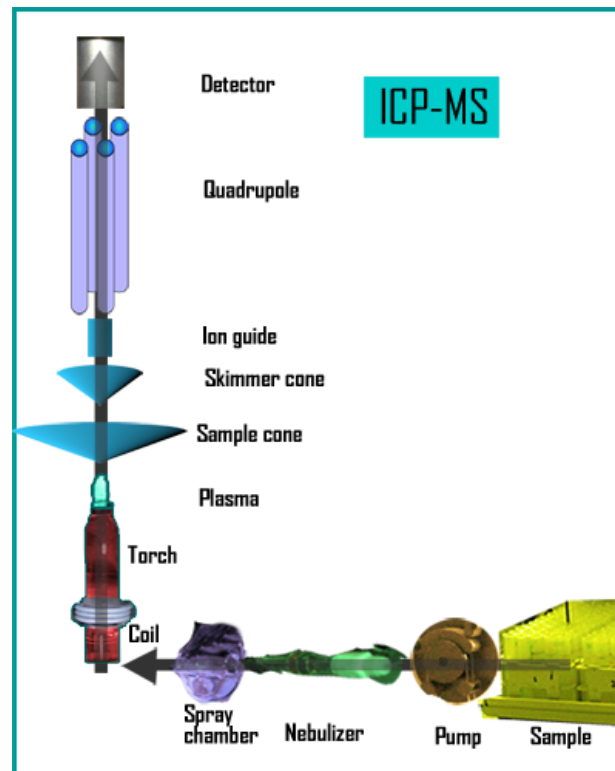


Figura 1. Esquema general de un Espectrómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (RadboundUniversity, 2016).

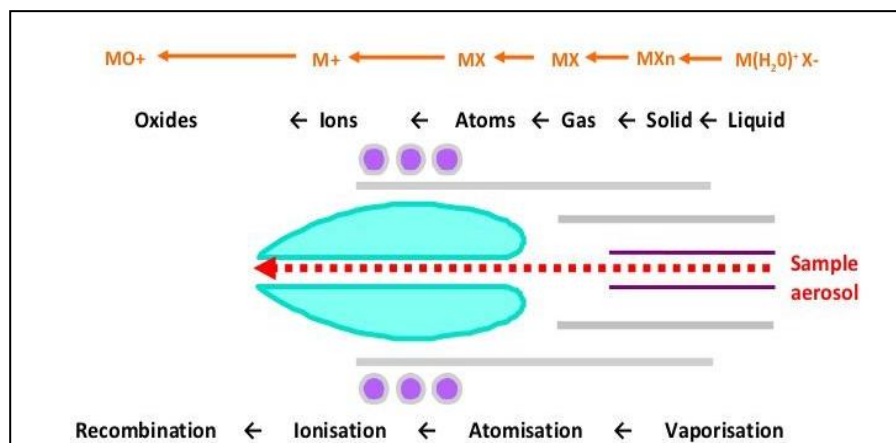


Figura 2. Proceso de ionización dentro de la antorcha del ICP-MS (RadboundUniversity, 2016).

8800 ICP-QQQ Características principales

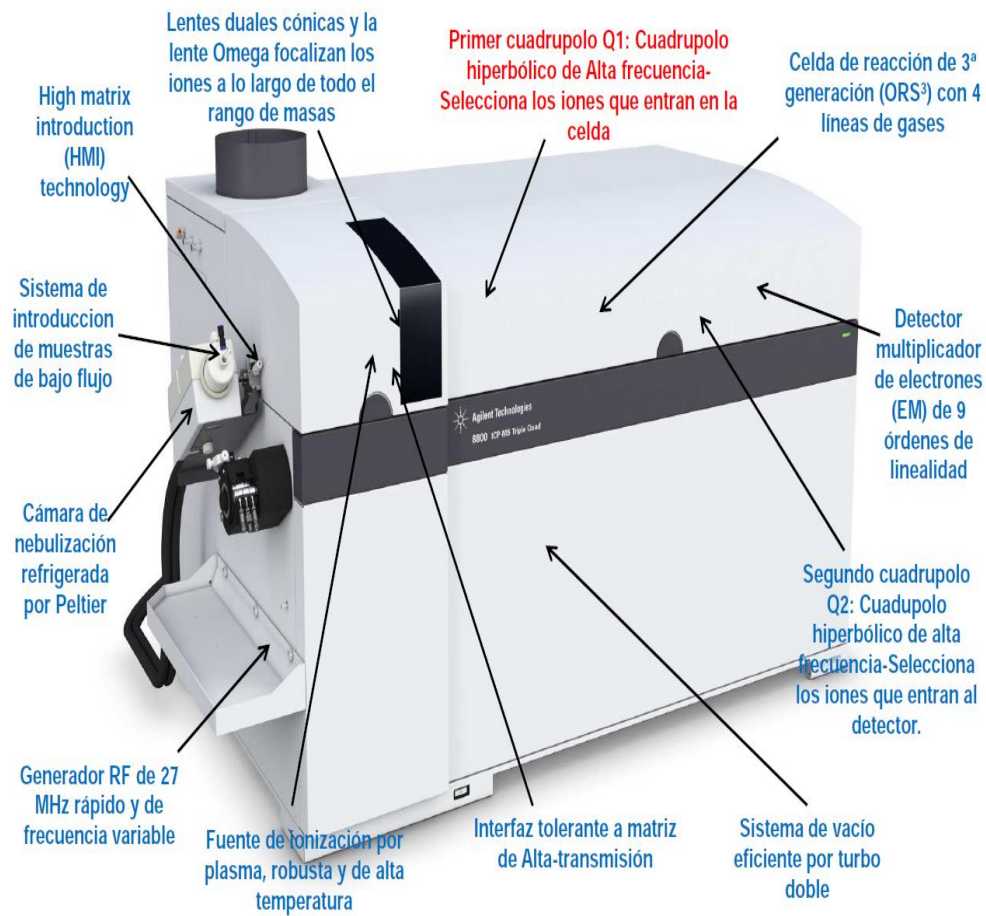


Figura 3. Esquema del espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente de triple cuadrupolo (Agilent ICP-QQQ) (Agilent Technologies, 2017).

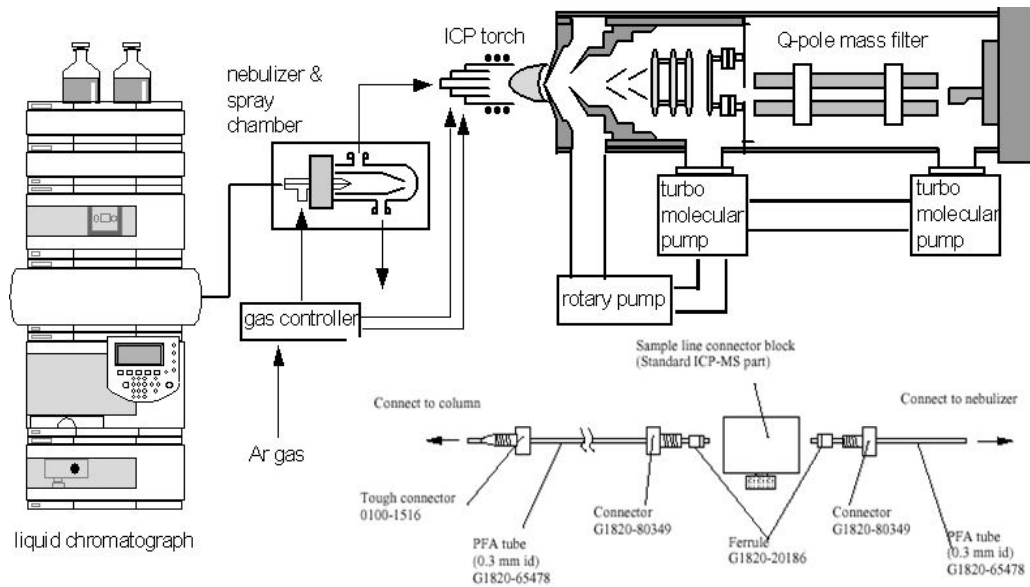


Figura 4. Esquemadel sistema de especiación LC-ICP-MS (Meyer, 2010).

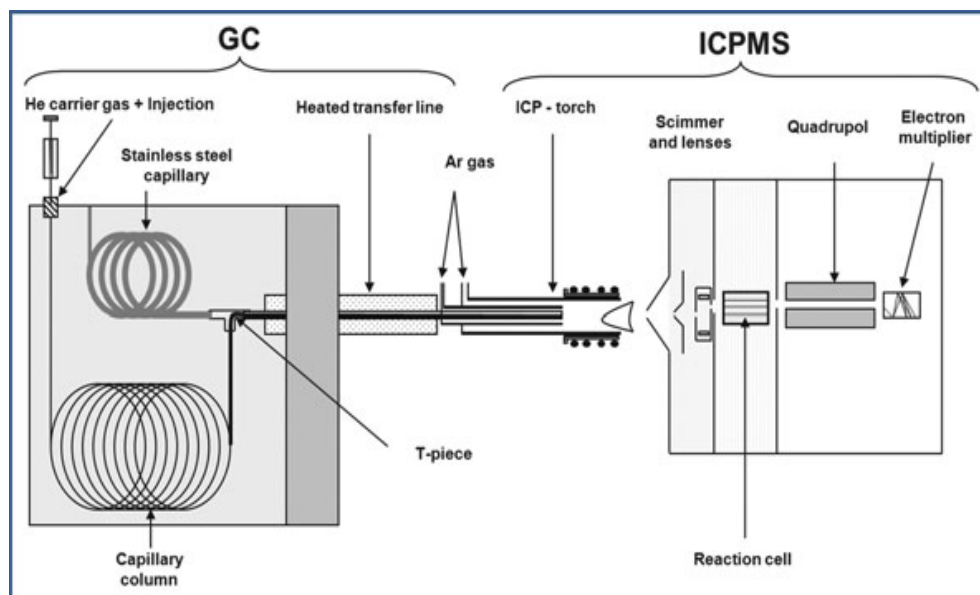


Figura 5. Esquemadel sistema de especiación GC-ICP-MS (Mothes&Mattusch, 2014).

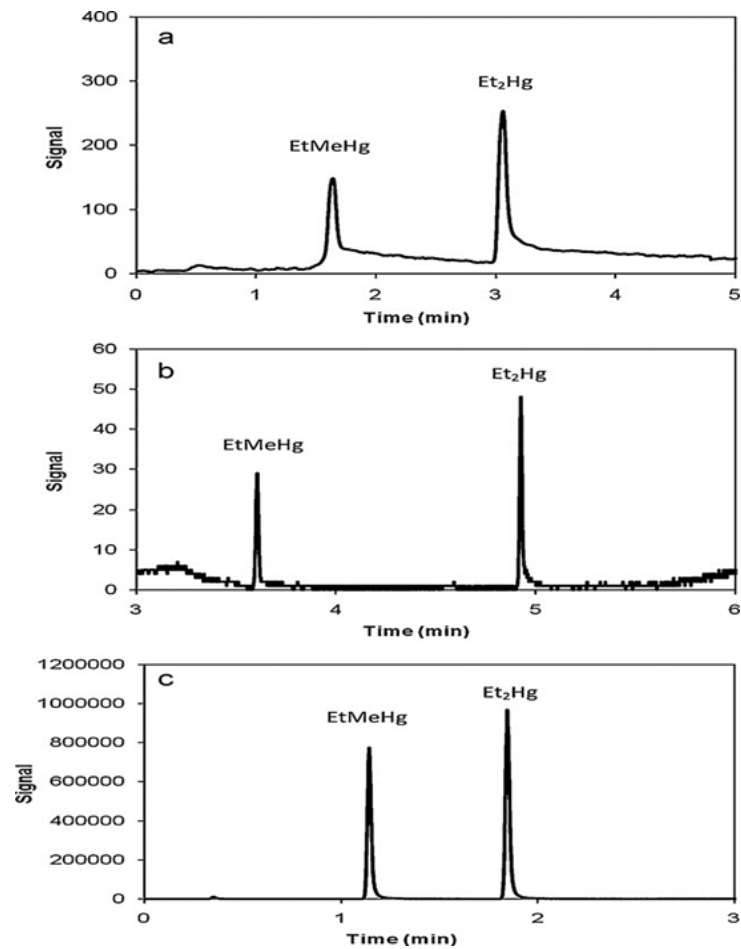


Figura 6. Cromatogramas obtenidos para MetHg y Hg²⁺ en tejidos de pescado usando etilación acuosa, después de extracción en microondas de los MRCs.GC-piro-AFS. (a). GC-MS (b) y GC-ICP-MS (c) (Berzas *et al.*, 2011).

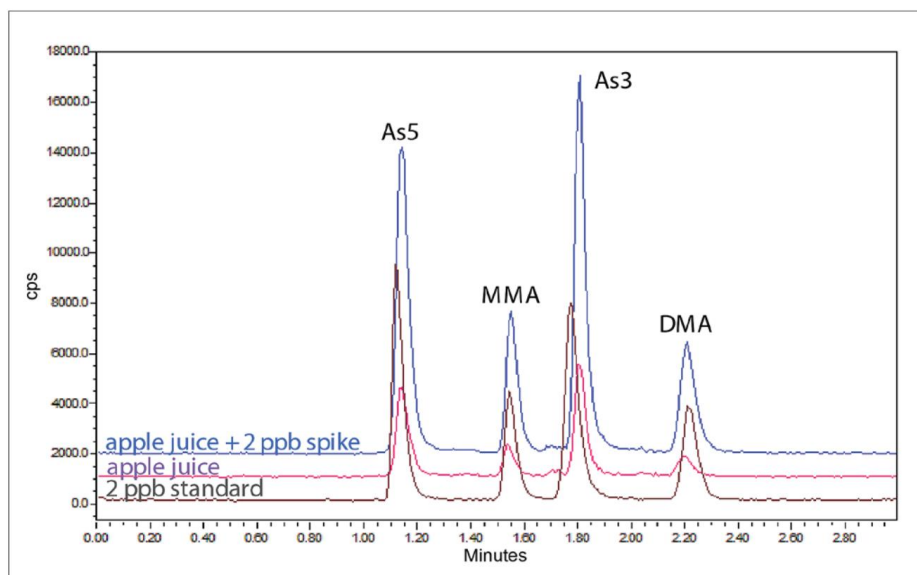


Figura 8. Cromatogramas de jugo de manzana sin diluir enriquecido con 2 ppm de especies de arsénico, jugo de manzana sin diluir y 2 ppm de una mezcla de estándares de arsénico (Ernstberger y Neubauer, 2012).

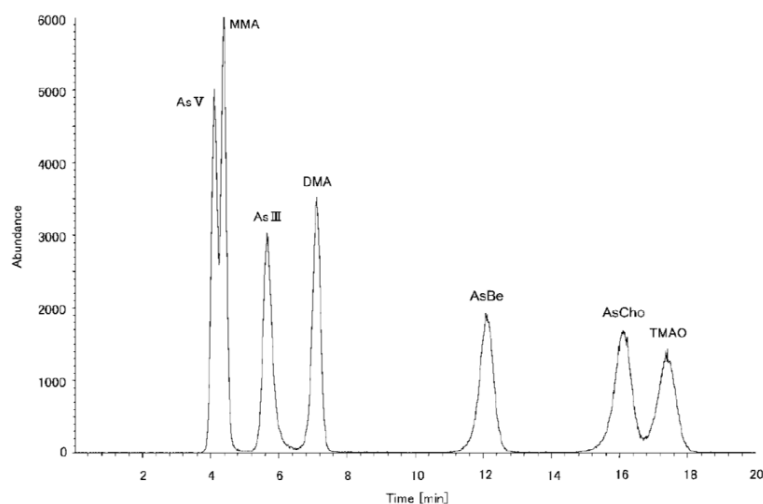


Figura 7. Cromatogramas de una solución estándar de arsénico por HPLC-ICP-MS. Contiene en su composición siete componentes de arsénico (10 $\mu\text{g/L}$ As). As III, arsenito; As V, arsenato; MMA, ácido monometilarsónico; DMA, ácido dimetilarsínico; AsBe, arsenobetaína; AsCho, arsenocolina; TMAO, óxido de trimetilarsina (Hataet *al.*, 2007).

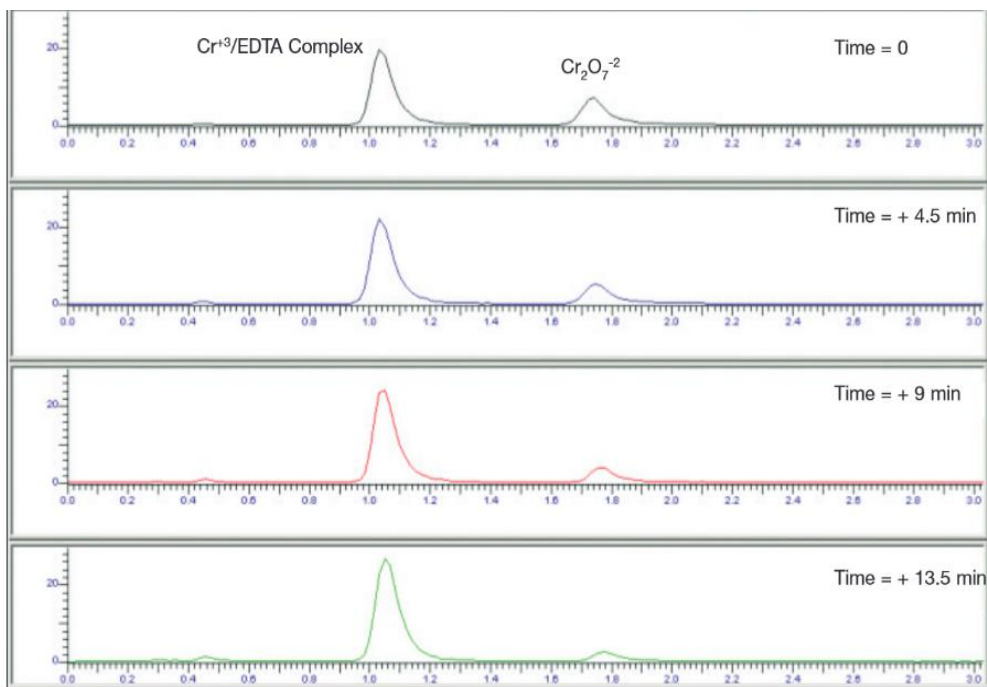


Figura 9. Efecto del uso de viales de polipropileno para la separación de Cr^{+3} y Cr^{+6} . A medida que corre el tiempo, existe una interconversión entre Cr^{+6} a Cr^{+3} (Neubauer *et al.*, 2003).

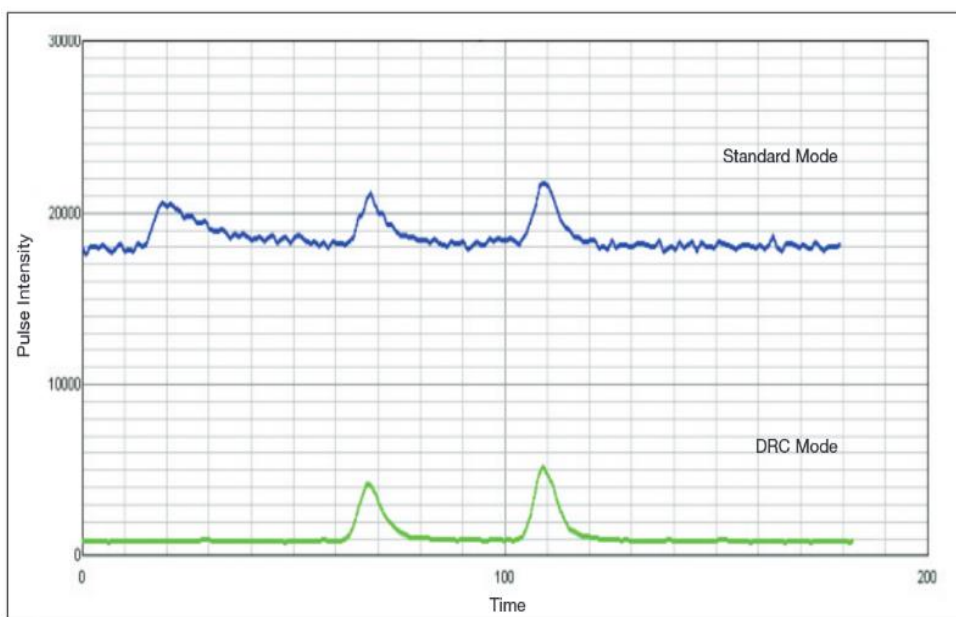


Figura 10. Comparación entre el modo DRC y el modo estándar de 1ppb de Cr^{+3} y Cr^{+6} . En el cromatograma superior en modo estándar presenta un elevado ruido de fondo y una baja relación S/N, además un pico desconocido se observa al inicio del cromatograma. A diferencia del cromatograma de abajo donde se utilizó una celda de reacción dinámica, la línea base presenta menor ruido (background bajo) y la relación S/N es alta (Neubauer *et al.*, 2003).

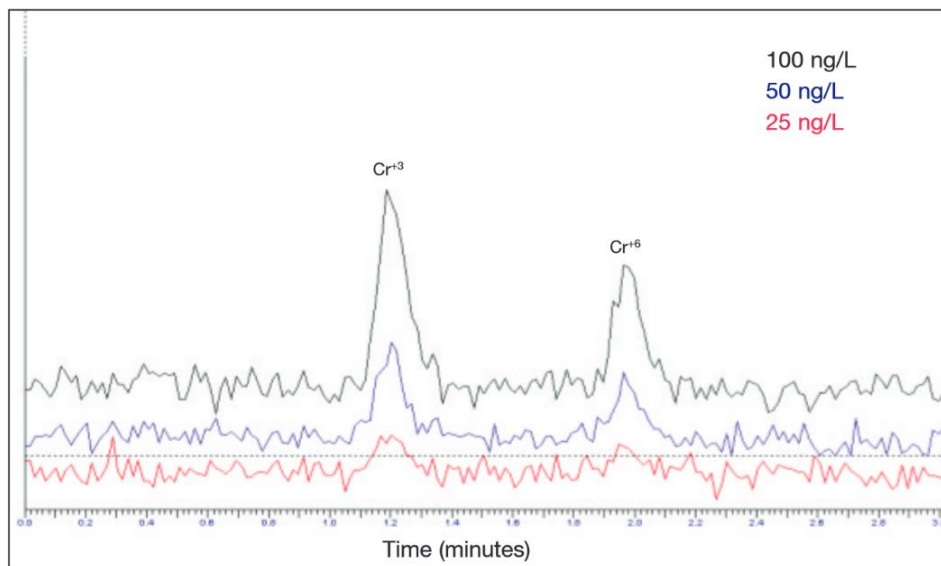


Figura 11. Cromatogramas de 25, 50 y 100 ng/L de especies de cromo para determinar el límite de detección. La concentración de 50 ng/L tuvo una relación S/N de 3, por lo que el límite de detección para cada especie fue de 50 ng/L (Neubauer *et al.*, 2003).

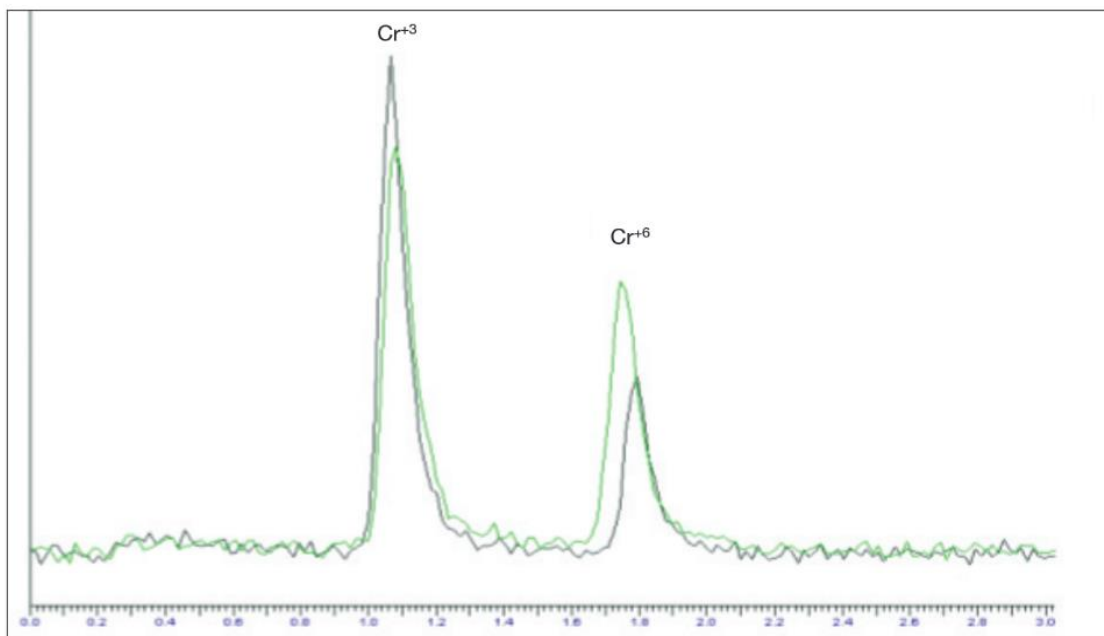


Figura 12. Cromatogramas de muestra de agua enriquecida con cromo: 0,5 µg/L (negro) y estándar de calibración 0,5 µg/L (verde) (Neubauer *et al.*, 2003).

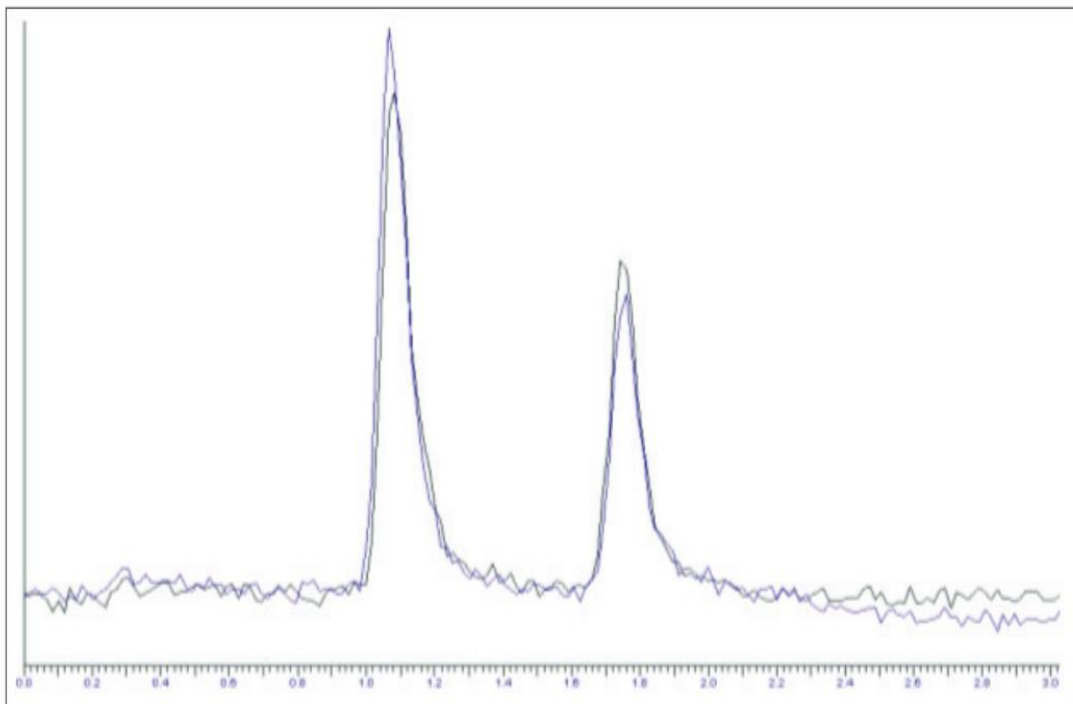


Figura 13. Cromatogramas de muestra de agua enriquecida con cromo 0,5 $\mu\text{g/L}$ diluida 5x (azul) y estándar de calibración 0,5 $\mu\text{g/L}$ (negro) (Neubauer et al., 2003).

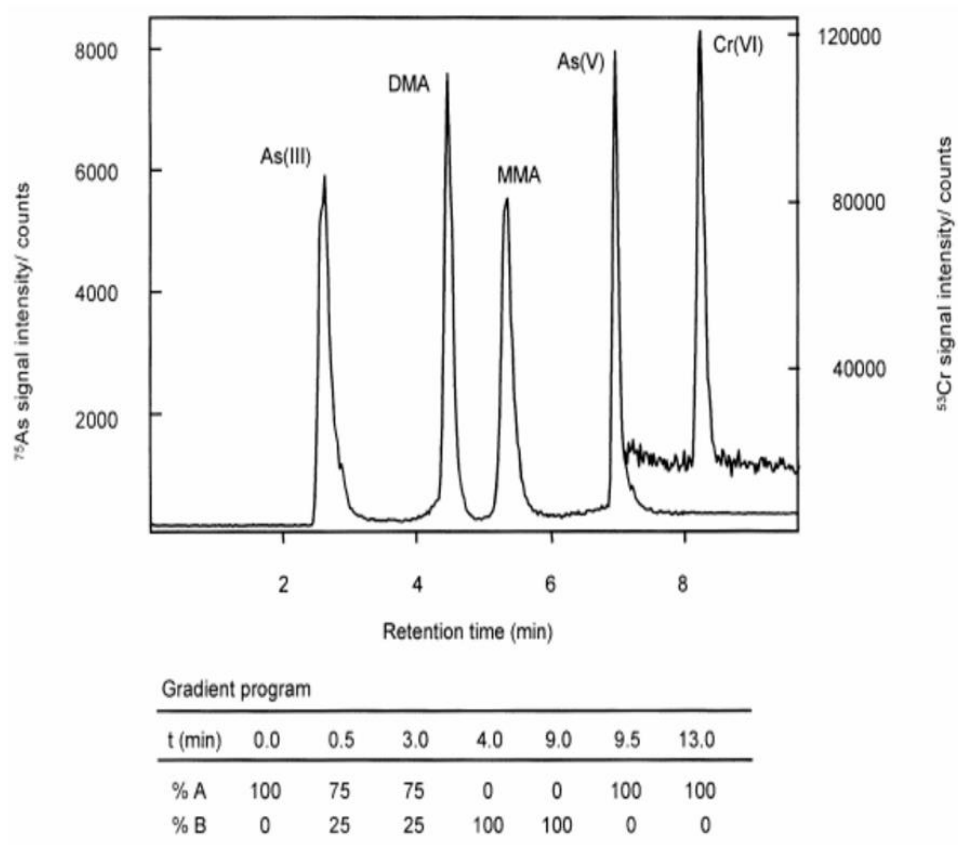


Figura 14. Cromatograma obtenido con un HPLC-ICP-MS de una mezcla de estándares con una columna Hamilton PRP-X100. Las concentraciones de todas las especies fue 3,4 $\mu\text{g/L}$ para las especies de arsénico y 200 $\mu\text{g/L}$ para Cr (VI) (Roia *et al.* 2001).

TABLAS

Tabla 1. Modos de separación en HPLC (Snyder *et al.*, 2011).

Modo cromatográfico	Descripción
C. fase reversa (RPC)	La columna es no polar (C_{18}), y la fase móvil es una mezcla polar de agua y solvente orgánico (acetonitrilo); RPC es el modo más usado, especialmente para muestras solubles en agua.
C. fase normal (NPC)	La columna es polar (sílica), y la fase móvil es una mezcla de solventes orgánicos menos polares (hexano con cloruro de metileno); NPC es principalmente usada para muestras insolubles en agua, en HPLC preparativa y la separación de isómeros.
C. fase reversa no-acuosa (NARP)	La columna es no-polar (C_{18}) y la fase móvil es una mezcla de solventes orgánicos (acetonitrilo con cloruro de metileno); NARP es usado para muestras muy hidrofóbicas e insolubles en agua.
C. interacción hidrofílica (HILIC)	La columna es polar (sílica o sílica con grupos amino), y la fase móvil es una mezcla de agua con solvente orgánico (acetonitrilo); HILIC es usado para muestras que tienen una alta polaridad y por lo tanto poco retenidas en RPC.
C. intercambio de iones (IEC)	La columna posee una resina de intercambio iónico, tiene grupos cargados que pueden enlazarse a iones de la muestra cargados opuestamente, y la fase móvil es usualmente una solución acuosa de una sal más un buffer; IEC es usado para separaciones de muestras ionizables como ácidos o bases, y especialmente para la separación de grandes bio-moléculas (proteínas y ácidos nucleicos).
C. par iónico (IPC)	Se usan las mismas condiciones que en RPC, excepto que un par iónico reactivo es añadido a la fase móvil para interactuar con los iones de la muestra de carga opuesta; IPC es útil para la separación de ácidos o bases que son débilmente retenidos en RPC.
C. exclusión de tamaño (SEC)	Una columna inerte es usada con una fase móvil acuosa u orgánica; SEC separa en base del peso molecular y es usada principalmente para grandes bio-moléculas o polímeros sintéticos.

Tabla 2. Interferencias poli atómicas e interferencias elementales de carga doble para los isótopos más importantes de cromo, arsénico y mercurio en ICP-MS (Gray *et al.*, 2015).

Isótopo	Abundancia	Interferencias poli atómicas	Interferencias elementales carga doble
52Cr	83.76	35Cl16O1H ⁺ , 40Ar12C ⁺ , 36Ar16O ⁺ , 37Cl15N ⁺ , 34S18O ⁺ , 36S16O ⁺ , 38Ar14N ⁺ , 36Ar15N1H ⁺ , 35Cl17O ⁺	104Pd ⁺⁺ , 104Ru ⁺⁺
53Cr	9.51	37Cl16O ⁺ , 38Ar15N ⁺ , 38Ar14N1H ⁺ , 36Ar17O ⁺ , 36Ar16O1H ⁺ , 35Cl17O1H ⁺ , 35Cl18O ⁺ , 36S17O ⁺ , 40Ar13C ⁺	106Pd ⁺⁺ , 106Cd ⁺⁺
75As	100.00	40Ar35Cl ⁺ , 59Co16O ⁺ , 36Ar38Ar1H ⁺ , 38Ar37Cl ⁺ , 36Ar39K ⁺ , 43Ca16O2 ⁺ , 23Na12C40Ar ⁺ , 12C31P16O2 ⁺	150Sm ⁺⁺ , 150Nd ⁺⁺
201Hg	13.18	---	---
202Hg	29.86	186W 16O ⁺	---

Tabla 3. Comparación ICP-MS con otras técnicas de espectrometría atómica.

Los excelentes límites de detección, la capacidad de análisis multi elemental e isotópico de manera precisa, el amplio rango dinámico de trabajo son los principales factores para la elección de un espectrómetro de masas acoplado inductivamente como detector para el análisis de especiación (Thermo Elemental, 2001).

	FAAS	GFAAS	ICP-AES	ICP-MS
Límites de detección	1-10 ppt	sub-ppb	1-10ppb	sub-ppm
Eficiencia	10-15 s/elemento	3-4 min/elemento	1-60 elementos/min	Mayoría de elementos en < 1min
Rango dinámico	10 ³	10 ²	10 ⁶	10 ⁹ -10 ¹¹
Precisión	0,1-1.0%	0.5-5%	0.1-2%	0.5-2%
Sólidos disueltos	0.5-5%	> 20%	0-20%	0.1-0.4%
Volumen de muestra	Grande	Muy poco	Mediano	Muy poco a mediano
Análisis semicuantitativo	No	No	Si	Si
Análisis isotópico	No	No	No	Si
Dificultad de uso	Muy fácil	Moderado	Fácil	Moderado
Automatización	No	Si /No	Si	Si
Costo equipo	Bajo	Medio a alto	Alto	Muy alto
Costo mantenimiento	Bajo	Medio	Alto	Alto
Interferencias espectrales	Muy pocas	Muy pocas	Muchas	Pocas

Tabla 4. Especiación de mercurio en cabello de habitantes de la Amazonía Brasileira cuyo antecedente es el consumo de pescado (Valores medios, n=3) (Souza *et al.*, 2010).

Muestra	iHg(μg/g)	MetHg(μg/g)	EtHg(μg/g)	Total Hg(μg/g)	Total Hg CV-AAS(μg/g) (Bruhnet <i>et al.</i> , 1994)
1	0,32	3,12	<0,038	3,44	3,6
2	0,37	10,93	<0,039	11,3	12,5
3	0,34	4,54	<0,040	4,88	4,6
4	0,39	5,3	<0,041	5,69	5,5
5	0,11	2,23	<0,042	2,34	2,2

Tabla 5. Condiciones Instrumentales del SPME-GC-ICP-MS para el análisis de especiación de mercurio en agua de mar (Bravo *et al.*, 2004).

Condiciones SPME	
Parámetro	Condición
Recubrimiento de la fibra	100 μm polimetilsiloxano
Tiempo de extracción	5 min
Temperatura de extracción	25 °C
Temperatura de desorción	250 °C
Condiciones GC	
Parámetro	Condición
Modo de inyección	<i>Split / splitless</i>
Tiempo de desorción	1 min
Tiempo <i>splitless</i>	1 min
Temperatura de inyección	250 °C
Columna	HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm)
Gas <i>carrier</i> /presión <i>inlet</i>	He/15 psi
Temperatura programada	50 °C (1min) a 250 °C (0,5 min) en 30 °C/min
Condiciones ICP-MS	
Parámetro	Condición
Energía RF	1300 W
Gas <i>carrier</i> / flujo	Ar / 1,4 L/min
Flujo intermedio	1 L/min
Flujo del gas de salida	15 L/min

Tabla 6. Parámetros del rendimiento del método SPME-GC-ICP-MS para la determinación de las especies de mercurio en muestras de agua de mar (Bravo *et al.*, 2004).

	MeHg		Hg ²⁺	
	Etilado	Propilado	Etilado	Propilado
LD (ng/L, n=3)	0,11	0,17	1,6	0,35
Precisión (R.S.D.%, n=3)	4,8	3,6	4,1	2,4
Linealidad r	0,9923	0,9965	0,9971	0,9996
R.S.D.f (%)	3,0	2,5	2,8	2,0

Tabla 7. Análisis del material de referencia de orina (NIES CRM No.18) con HPLC-ICP-MS (Hataet *al.*, 2007).

	As total	DMA	AsBe
Resultados (n=5) media \pm SD (μ g As/L)	131,5 \pm 1,2	37,2 \pm 0,5	70,1 \pm 1,0
Valor de referencia rango de tolerancia (μ g As/L)	137 \pm 11	36 \pm 9	69 \pm 12

Tabla 8. Valores medios de las especies de arsénico de 210 individuos japoneses (Hataet *al.*, 2007).

N		As total		As III		As V			
		µg As/L	µg As/L cre	µg As/L	µg As/L cre	µg As/L	µg As/L cre		
Media	210	141,3	114,9	3,5	3	0,1	0,1		
N		MMA		DMA		AsBe		Otros	
		µg As/L	µg As/L cre	µg As/L	µg As/L cre	µg As/L	µg As/L cre	µg As/L	µg As/L cre
Media	210	3.1	2.6	42.6	35.9	61.3	52.1	5.2	3.5

Tabla 9. Condiciones Instrumentales para el análisis de especiación de arsénico en arroz integral (Kobayashi&Shikino, 2010).

Condiciones del HPLC		Condiciones del ICP-MS	
Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Instrumento	Flexar HPLC	Instrumento	NexION 300D ICP-MS
Columna	4.6 mm x 250 mm, 5 µm	Energía RF	1600 W
Fase móvil	10 mmol/L ácido 1-butansulfónico, 4 mmol/L hidróxido de tetrametil amonio, 4 mmol/L ácido malónico, 0.05 % metanol, 0.03% ácido nítrico	Analito	As 75 m/z
		Celda	Metano, 0.3 mL/min
Flujo	0.8 mL/min		
Columna	Temperatura ambiente		
Vol. Inyección	10 µl		

Tabla 10. Resultados del análisis de especiación de arsénico en cinco muestras de arroz integral, límites de detección y cuantificación (Kobayashi&Shikino, 2010).

Especies	LOD	LOQ	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D	Muestra E
As (V)	0.00013	0.00044	0.021	0.043	0.044	0.040	0.053
As (III)	0.00012	0.00039	0.070	0.13	0.13	0.15	0.18
MMA	0.00014	0.00046	ND	ND	0.0013	ND	ND
DMA	0.00022	0.00072	0.0063	0.017	0.020	0.030	0.026

Tabla 11. Condiciones Instrumentales para el análisis de especiación de arsénico en jugo de manzana (Ernstberger&Neubauer, 2012).

Condiciones del HPLC		Condiciones del ICP-MS	
Parámetro	Condición	Parámetro	Condición
Columna	C18, 4.6x 250 mm, 5 µm	Nebulizador	Vidrio Concéntrico
Fase móvil	Ácido octadecilsulfónico (2mM) + Ácido malónico (2mM) + Metanol (1%)	Cámara de nebulización	Vidrio Concéntrico
pH	4.0 (ajustado con 10% NH ₄ OH)	Energía RF	1600 W
Flujo	1.5 mL/min	Flujo Nebulizador	Optimizado para <2% óxidos
Separación	Isocrática	Modo	Estándar
Temperatura de Columna	50 °C	Isótopo	75 As
Vol. Inyección	20µl	<i>Dwell time</i>	500 ms
Viales	Plástico, 1.5 mL	Muestreo	2 puntos/segundo

Tabla 12. Resultados de arsénico de las muestras de jugo de manzana (µg/L) (Ernstberger&Neubauer, 2012).

Muestra	As (V)	As (III)	MMA	DMA	As total
1	0,94	0,52	< LD	0,49	1,95
2	0,76	0,64	< LD	0,38	1,78
3	1,5	1,1	0,09	0,33	3,02
4	0,73	0,19	0,05	0,2	1,17
5	0,82	0,98	0,56	0,43	2,79
6	0,32	0,75	0,09	0,48	1,64
7	0,75	1,1	0,18	0,42	2,45

Tabla 13. Condiciones Instrumentales del ICP-MS para el análisis de especiación simultáneo de arsénico y cromo (Roig, 2001).

Condiciones ICP-MS	
Condición	Parámetro
Instrumento	HP 4500
Energía RF	1250 W
Flujo gas plasma	Ar 15 L/min
Flujo gas auxiliar	Ar 1 L/min
Flujo gas nebulizador	Ar 1,15 L/min
Profundidad de muestreo	7,8 mm
Masa de monitoreo	m/z 75,53,35
Tiempo de integración/masa	0,5 s
Detector	Multiplicador de electrones (1750 V)
Cámara de nebulización	2 ° C
Flujo introducción de muestra	1 mL/min

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Dalila Estefanía Rosero Valles, con CC. 1723026371, autora del trabajo de graduación titulado: **“Fundamento y Aplicaciones de Sistemas de Especiación con “Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente” (LC-ICP-MS y GC-ICP-MS)”**, previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 22 de junio del 2017

CC. 172302637-1

